

Pathomechanismen der Schlafapnoe im Mausmodell Rolle der endothelialen und induzierbaren NO-Synthase

Simone Kraut



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

Private Publikation - nur für interne Zwecke !

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author.

Private publication - for internal use only !

© 2014 by The Author



gedruckt von - printed at:

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem
Klinikum Veterinärmedizin,
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Andreas Moritz
und

dem Zentrum für Innere Medizin
Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Norbert Weißmann

Pathomechanismen der Schlafapnoe im Mausmodell
Rolle der endothelialen und induzierbaren
NO-Synthase

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Simone Kraut

Tierärztin aus Pforzheim

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität-Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Moritz
Prof. Dr. Norbert Weißmann

Tag der Disputation: 17.02.2014

Fantasie ist wichtiger als Wissen, denn Wissen ist begrenzt. Fantasie aber umfasst die ganze Welt.

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	1
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	5
1. Einleitung	10
1.1 Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom des Menschen	10
1.1.1 Definition und Klassifikation	10
1.1.2 Epidemiologie.....	11
1.1.3 Pathophysiologie und Risikofaktoren	12
1.1.4 Klinisches Bild	14
1.1.5 Therapie	15
1.2. Arterielle Hypertonie des Menschen	17
1.2.1 Definition und Klassifikation	17
1.2.2 Arterielle Hypertonie und Herzerkrankungen	19
1.2.3 Therapie	19
1.3 Pulmonale Hypertonie des Menschen	20
1.3.1 Definition und Klassifikation	20
1.3.2 Pathophysiologie	22
1.3.3 Therapie	23
1.4 Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom und Komorbiditäten	24
1.4.1 Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom und arterielle Hypertonie	24
1.4.2 Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom und pulmonale Hypertonie.....	26
1.5 Experimentelle Tiermodelle	27
1.5.1 Mausmodell der chronisch intermittierenden Hypoxie.....	28
1.6 Die NO-Synthase	30
1.6.1 NO-Synthase und das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom	31
1.6.2 Gendefiziente (knockout) Mäuse	32
1.7 Ziel der Arbeit	33
2. Material und Methoden	34
2.1 Material	34
2.1.1 Versuchstiere	34
2.1.2 Tierversuchsgenehmigung	34
2.1.3 Material und Geräte für das Mausmodell	34
2.1.4 Histologie	38

2.1.5 Molekularbiologie	40
2.2 Methoden	44
2.2.1 Mausmodell: chronisch intermittierende Hypoxie.....	44
2.2.2 Echokardiographie.....	49
2.2.3 Hämodynamische Messungen	52
2.2.4 Blutentnahme.....	54
2.2.5 Hämatokrit.....	54
2.2.6 Entnahme der Lunge.....	54
2.2.7 Entnahme der Blutgefäße	55
2.2.8 Entnahme des Herzens.....	56
2.2.9 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen	56
2.2.10 Molekularbiologische Untersuchungen	61
2.2.11 Statistische Auswertung	67
3 Ergebnisse.....	69
3.1 Das Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie und seine Einflüsse auf die WT, eNOS und iNOS KO Mäuse	69
3.1.1 Oxymetrische Messungen.....	69
3.1.2 Auswirkungen der Exposition in chronisch intermittierender Hypoxie.....	74
3.1.3 Ratio rechter Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum.....	76
3.1.4 Ratio von rechtem Ventrikel zu Körpergewicht	77
3.1.5 Ratio von linkem Ventrikel zu Körpergewicht.....	78
3.1.6 Ratio Herzgewicht zu Körpergewicht.....	78
3.1.7 Blutdrücke in den einzelnen Gruppen	79
3.2. Histologische Untersuchungen.....	95
3.2.1. Morphometrische Analyse der Lungengefäße - Muskularisierungsgrad	95
3.2.2 Histologische Analyse des Herzens – Kollagengehalt.....	97
3.3 Echokardiographische Untersuchungen.....	99
3.3.1 Cardiac output (CO) und cardiac index (CI).....	99
3.3.2 Ejection fraction (EF) - systolische Funktion des linken Ventrikels	100
3.3.3 LV/ RV peak systolic velocity - systolische Funktion des Herzens	101
3.3.4 TAPSE – systolische Funktion des rechten Ventrikels.....	102
3.3.5 IVRT – diastolische Funktion des Herzens	103
3.3.6 LV E'/A' peak diastolic velocities - diastolische Funktion des linken Ventrikels	104
3.3.7 MPI – globale Funktion des Herzens.....	104
3.3.8 Zusammenfassung der echokardiographischen Befunde	105
3.4. Molekularbiologische Untersuchungen.....	106
3.4.1 Genexpression von eNOS und iNOS in WT Mäusen	106

3.4.2 Proteinexpression von eNOS und iNOS in WT Mäusen	109
4. Diskussion.....	113
4.1 Wahl des Tiermodells	113
4.1.1 Chronische intermittierende Hypoxie.....	113
4.2. Physiologische Effekte der CIH auf die WT, iNOS KO und eNOS KO Mäuse	115
4.2.1 Auswirkungen der CIH auf die Gewichtsentwicklung	115
4.2.2 Auswirkungen der CIH auf den Hämatokrit.....	116
4.2.3 Auswirkungen der CIH auf die Entwicklung einer arteriellen und pulmonalen Hypertonie sowie einer Herzhypertrophie	116
4.3 Histologisch untersuchte Effekte der CIH auf die WT, iNOS KO und eNOS KO Mäuse.....	120
4.3.1 Auswirkungen der CIH auf den Muskularisierungsgrad der kleinen pulmonalen Gefäße	120
4.3.2 Auswirkungen der CIH auf den Kollagengehalt der Herzfasern	121
4.4 Echokardiographisch untersuchte Effekte der CIH auf die WT, iNOS KO und eNOS KO Mäuse	123
4.4.1 Auswirkungen der CIH auf die systolische Funktion des Herzens.....	123
4.4.2 Auswirkungen der CIH auf die diastolische Funktion des Herzens	124
4.4.3 Auswirkungen der CIH auf die globale Funktion des Herzens	124
4.4.4 Interpretation der echokardiographisch ermittelten Daten.....	125
4.5 Molekularbiologische Untersuchungen.....	127
4.5.1 Genexpression der Enzyme eNOS und iNOS.....	127
4.5.2 Proteinexpression der Enzyme eNOS und iNOS	129
4.6 Resümee der kardialen Befunde	132
5. Zusammenfassung.....	133
6. Summary.....	135
7 Literaturverzeichnis.....	136
8. Abbildungsverzeichnis.....	150
9. Tabellenverzeichnis	154
10. Eidesstattliche Erklärung.....	156
11. Wissenschaftliche Beiträge	157
11.1 Veröffentlichungen.....	157
11.2 Kongressbeiträge.....	157

11.3 Preise	158
<i>12. Danksagung.....</i>	<i>159</i>

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A.	Arteria (Arterie)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALK-1	Aktivin-like kinase Typ-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B2M	Beta2-Mikroglobulin
BH4	Tetrahydrobiopterin
BMI	Body-Mass-Index
BMPR2	bone morphogenetic protein receptor type-2
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary deoxyribonucleic acid)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat (cyclic guanosine monophosphate)
CI	Herzindex (cardiac index)
CIH	chronische intermittierende Hypoxie
cm	Zentimeter
CO	Herzminutenvolumen (cardiac output)
CPAP	nächtliche Überdruckbeatmung (continuous positive airway pressure)
CO ₂	Kohlendioxid
Ct-Werte	cycle threshold Werte
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNAse	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

Abkürzungsverzeichnis

EDV	enddiastolisches Volumen
EDS	endsystolisches Volumen
EF	Auswurffraktion (ejection fraction)
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale NO-Synthase (endothelial NO synthase)
et al.	und andere
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid (flavin adenine dinucleotide)
FMN	Flavin-Mononukleotid (flavin mononucleotide)
g	g-Kraft, Erdbeschleunigung
gr	Gramm
G	Gauge
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HF	Herzfrequenz
Hkt	Hämatokrit
Hox	Hypoxie
HPAH	hereditäre pulmonalerterielle Hypertonie
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
ICD	internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (international statistical classification of diseases and related health problems)
I.E.	internationale Einheiten
i.p.	intraperitoneal
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase (inducible NO synthase)
IPAH	idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie
IVRT	isovolumetrische Relaxationszeit (isovolumic relaxation time)
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kiloDalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KO	knockout
l	Liter
LAUP	laserassistierte Uvulopalatopharyngoplastik
LV	linker Ventrikel

Abkürzungsverzeichnis

LVOT	linksventrikulärer Ausflusstrakt (left ventricular outflow tract)
m	Meter
M	Molar
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MPI	myocardial performance index
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N.	Nervus (Nerv)
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaN ₃	Natriumacid
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale NO-Synthase (neuronal NO synthase)
NO	Stickstoffmonoxid
NOS1	neuronale NO-Synthase
NOS2	induzierbare NO-Synthase
NOS3	endotheliale NO-Synthase
Nox	Normoxie
Nr.	Nummer
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid
ODI	Zahl der Sauerstoffsättigungsabfälle je Schlafstunde (oxygen desaturation index)
OHS	Obesitas-Hypoventilationssyndrom (obesity hypoventilation syndrom)

Abkürzungsverzeichnis

OSAS	obstruktives Schlafapnoe-Syndrom
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie (pulmonary arterial hypertension)
PAP	pulmonalarterieller Druck (pulmonary arterial pressure)
PAPm	mittlerer pulmonalarterieller Druck
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PC	personal Computer
pCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck (carbon dioxide partial pressure)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDE	Phosphodiesterase
pg	Pikogramm
PH	pulmonale Hypertonie
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck (oxygen partial pressure)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RT-PCR	Echtzeit Polymerase-Kettenreaktionen (real time polymerase chain reaction)
RV	rechter Ventrikel
RVSP	rechtsventrikulärer systolischer Druck (right ventricular systolic pressure)
S	Septum
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide)
sec.	Sekunde
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SV	Schlagvolumen
Tab.	Tabelle
TAPSE	tricuspid annular plane systolic excursion
TBST	Tris gepufferte Kochsalzlösung (tris buffered saline) mit Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
UPPP	Uvulopalatopharyngoplastik
UPS	Unterkieferprotrusionsschiene
V.	Vena (Vene)
v.a.	vor allem

Abkürzungsverzeichnis

v/v	Volumenkonzentration (m^3/m^3)
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
VTI	Geschwindigkeits-Zeit-Integral (velocity time integral)
w/v	Massenkonzentration (g/100ml)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
μm	Mikrometer

1. Einleitung

1.1 Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom des Menschen

1.1.1 Definition und Klassifikation

Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom (OSAS) ist eine weitverbreitete Erkrankung und die am häufigsten vorkommende schlafbezogene Atmungsstörung (**Sankri-Tarbichi** 2012). Gekennzeichnet ist sie durch eine wiederkehrende Verengung der Atemwege während der Schlafphase. Diese Obstruktion führt zu einem Atemstillstand (Apnoe) und daraus folgender Hypopnoe, Hypoxämie und einer Erhöhung des arteriellen pCO_2 . Bei einer mindestens 10 Sekunden andauernden Verringerung der Atemamplitude oder der Bewegung der Brustwand auf unter 25% spricht man von einer Apnoe. Eine Abnahme von unter 70% wird als Hypopnoe bezeichnet. Das Schlafapnoe-Syndrom des Menschen kann anhand der unterschiedlichen Mechanismen, die die Entstehung der Apnoephasen hervorrufen, in zwei Kategorien unterteilt werden: Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom ist dadurch charakterisiert, dass ein teilweiser oder kompletter Verschluss der oberen Atemwege aufgrund anatomischer Veränderungen vorliegt, wohingegen das weitaus seltener vorkommende zentrale Schlafapnoe-Syndrom durch Reizleitungsstörungen des zentralen Nervensystems zu den für die Atmung relevanten Muskelgruppen zustande kommt (**Banno** 2007) (Tabelle 1.1.1).

G47.-	Schlafstörungen
G47.3-	Schlafapnoe
	Exkl.: Pickwick-Syndrom (E66.29)
	Schlafapnoe beim Neugeborenen (P28.3)
G47.30	Zentrales Schlafapnoe-Syndrom
G47.31	Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom
G47.38	Sonstige Schlafapnoe
G47.39	Schlafapnoe, nicht näher bezeichnet

Tabelle 1.1.1: Klassifikation des Schlafapnoe-Syndroms nach ICD-10 (ICD-10 online, WHO- Version 2013 (**Thorpy** 2012; **Krollner** 2013a))

Zur Einteilung des Schweregrades des obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms wird der Apnoe-Hypopnoe-Index (AHI) herangezogen (Tabelle 1.1.2). Dieser ist definiert als die totale Anzahl der Apnoe- bzw. Hypopnoe-Ereignisse pro Stunde Schlaf. Vom OSAS spricht man erst ab einem AHI ≥ 5 sowie typischen klinischen Symptomen (z.B. Schnarchen, Tagesschläfrigkeit, nicht erholsamer Schlaf, Konzentrationsschwierigkeiten) (**Banno** 2007). Ein weiterer wichtiger Parameter, um den Schweregrad des OSAS einzuteilen, ist der oxygen desaturation index (ODI). Dieser gibt die Zahl der Abfälle in der Sauerstoffsättigung je Stunde Schlaf an. Eine Studie von Chung et al. zeigte, dass der ODI stark mit dem AHI korreliert. Weiterhin ist ein ODI von >5 , >15 bzw. >30 ein guter Prädiktor für einen AHI von >5 , >15 oder >30 (**Chung** 2012).

Schweregrad	AHI
Leicht	$\geq 5-15$
Mittel	15-30
Schwer	>30

Tabelle 1.1.2: Einteilung des Schweregrades des obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms nach Recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research (**AASM** 1999)

1.1.2 Epidemiologie

Eine Studie von Young et al. in den USA zeigte nach Untersuchungen im Schlaflabor bei 2% der Frauen und 4% der Männer ein klinisch manifestes OSAS (AHI ≥ 5). Die Prävalenz betrug bei Frauen 9% und bei Männern 24% im Alter zwischen 30 und 60 Jahren. Zusammenfassend war in allen Altersgruppen bei Männern eine deutlich höhere Prävalenz des OSAS zu beobachten (**Young** 1993).

Für Westeuropa war anhand der Studie von Ohayon et al. eine Prävalenz für das OSAS von 1,9% (Großbritannien), 1,8% (Deutschland) und 1,1% (Italien) zu erkennen. Hierbei wurden die Daten mit Hilfe eines standardisierten Interviews (SLEEP-EVAL) gewonnen (**Ohayon** 2000).

Ähnliche Ergebnisse für Großbritannien konnte auch die British Thoracic Society mit einer Prävalenz von 0,5 bis 1% für die mittlere bis schwere Form des OSAS

nachweisen. Auch hier war die Prävalenz bei Frauen geringer als bei Männern (**BTS** 2007).

Mit Hilfe von polysomnographischen Untersuchungen wurden die Daten von Punjabi ermittelt, der für Nordamerika, Europa, Australien und Asien ähnliche Prävalenzen von 3-7% bei Männern und 2-5% bei Frauen feststellte. Diese Daten sind hinsichtlich der klinischen Symptomatik nicht korrigiert, zeigen allerdings, wie ähnlich die Prävalenzen weltweit sind. Dies führt zu der Vermutung, dass das OSAS eine Erkrankung ist, die sowohl in Industrie- als auch in Entwicklungsländern weit verbreitet ist (**Punjabi** 2008).

Genaue Aussagen über die weltweite Prävalenz zu machen ist allerdings schwierig, da bei mehr als 85% der Patienten mit klinischen Anzeichen das OSAS nicht diagnostiziert wurde. Somit stellt der Anteil der Patienten, auf den sich viele Studien beziehen, nur die Spitze des Eisberges der an OSAS erkrankten Menschen dar, wie eine Studie der American Heart Association und des American College of Cardiology zeigte (**Somers** 2008).

1.1.3 Pathophysiologie und Risikofaktoren

Die pathophysiologischen Vorgänge des OSAS sind charakterisiert durch die oropharyngale Obstruktion, die Hypoxämie und die zentralnervöse Aktivierungsreaktion (Arousal). Die Obstruktion der Atemwege erfolgt zumeist in dem Bereich des Pharynx der nicht durch Knorpel oder Knochen vor einem Kollaps geschützt ist (**Somers** 2008). Zur teil- oder vollständigen Obstruktion der Atemwege kommt es aufgrund des Zurücksinkens der Zunge gegen den weichen Gaumen sowie durch den Kollaps der Muskulatur des Oropharynx. Dieser Kollaps des Pharynx entsteht, wenn sich das Gleichgewicht zwischen der Kraft der Pharynxmuskulatur und dem auf die Pharynxwand ausgeübten Sog verschiebt (**Rauscher** 1992).

Sinkt nun während des Schlafes der Tonus der oberen Atemwegsmuskulatur ab und liegen abnormale anatomische Veränderungen vor (zu enge Atemwege, vergrößerte Tonsillen, Fettablagerungen, Brachy- und Retrognathie), führt dies zu einer Verengung des Pharynx und einer Steigerung der Strömungsgeschwindigkeit (**Rauscher** 1992). Zum Kollaps der oropharyngalen Muskulatur und damit zum vollständigen Verschluss kommt es erst, wenn der Verschlussdruck durch den

Pharynx den negativ intraluminalen Druck unterschreitet. Bedingt durch die Okklusion wird der Sauerstoffaustausch behindert/erschwert, wodurch es zu Apnoe- oder Hypopnoephasen mit Hypoxämie und Hyperkapnie sowie einer Erhöhung des $p\text{CO}_2$ und Erniedrigung des $p\text{O}_2$ kommt. Hierdurch entsteht eine Steigerung der Atemleistung mit starker Kontraktion des Zwerchfells (**Rauscher** 1992). Diese Kontraktionen und die sich verschlechternden Blutgaswerte aktivieren den Sympathikus und gipfeln so im Arousal und damit in einer Weckreaktion des Menschen. Kennzeichnend für diese Phase ist ein lautes Schnarchen, das mit einer kurzen Hyperventilationsphase und einem maximalen Anstieg des Blutdruckes verbunden ist (**Rauscher** 1992; **Bonsignore** 1994; **Somers** 2008).

Durch die Unterbrechung des Schlafes kommt es zu einer Erhöhung des Muskeltonus und schließlich zur Öffnung des Pharynx, was zur Folge hat, dass sich Blutgase und Atmung wieder normalisieren und der Mensch wieder einschläft. Hiernach wiederholt sich der Zyklus von neuem (**Rauscher** 1992). Diese wiederkehrenden Hypoxie-Episoden und die sich daran anschließende Reoxygenierung werden auch als chronisch intermittierende Hypoxie (CIH) bezeichnet und können zu einer Aktivierung der Entzündungskaskade sowie zu oxidativem Stress und endothelialer Dysfunktion führen (**Dyugovskaya** 2003).

Die Unterbrechungen des Schlafes werden zwar meistens nicht bewusst wahrgenommen, führen aber zu den typischen Symptomen des OSAS, darunter Tagesmüdigkeit, nicht erholsamer Schlaf und verminderte Konzentrationsfähigkeit (**Rauscher** 1992; **Banno** 2007).

Wie Tabelle 1.1.3 zeigt sind die Risikofaktoren für die Pathogenese des OSAS vielfältig. Prädisponierend sind anatomische, genetische, metabolische und endokrine Faktoren. Zusätzlich bewirkt die Einnahme mancher Substanzen eine Verringerung des Muskeltonus und birgt somit ein zusätzliches Risiko. Der Hauptprädiktor ist jedoch Adipositas (**Prabhat** 2012).

- Adipositas
 - 10% Gewichtszunahme → 32% Erhöhung des AHI
 - 10% Gewichtsabnahme → 26% Verringerung des AHI
- Geschlecht
 - Männer sind häufiger betroffen:
 - mehr weiches Gewebe im Nacken
 - dickerer Nackenumfang
 - ↑Kollapsgefahr der oberen Luftwege
- Alter
 - Personen ≥ 65 Jahre → 2-3-fach höhere Prävalenz
- Familiäre/ Genetische Prädisposition
- Ethnische Zugehörigkeit
 - Asiaten
- Besonderheiten der kraniofazialen Anatomie
 - Retrognathie
 - Vergrößerte Tonsillen oder Adenoide
 - Verengung der Atemwege
- Menopause
- Endokrinopathien
 - Hypothyreose
 - Akromegalie
- Konsum von:
 - Alkohol
 - Zigaretten
 - Sedativa

Tabelle 1.1.3: Risikofaktoren des obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms (Young 2002; Banno 2007; Punjabi 2008; Zhang 2012a)
--

1.1.4 Klinisches Bild

Die Merkmale des OSAS sind vielfältig und können in schlafbezogene und nichtschlafbezogene Symptome unterteilt werden. Die schlafbezogenen Leitsymptome können wiederum in tägliche und nächtliche Anzeichen aufgeteilt werden. Tagsüber kann exzessive Tagesmüdigkeit, Depression, Müdigkeit, Gedächtnisstörung, Morgenübelkeit oder morgendlicher Kopfschmerz sowie Impotenz festgestellt werden. Zu den nächtlichen Symptomen gehören Schnarchen, Keuchen, Schnappatmung, vom Partner beobachtete Atempausen und Nykturie. Die nichtschlafbezogenen Merkmale des OSAS können in drei Gruppen gegliedert werden:

- kardiovaskuläre Erkrankungen (z.B. Pulmonale Hypertonie, arterielle Hypertonie, Arrhythmie)
- psychische Störungen (z.B. Depression, Schizophrenie)
- metabolische Erkrankungen (z.B. Diabetes mellitus Typ 2, Insulinresistenz)

Diese stellen die mit dem OSAS einhergehenden Komorbiditäten dar (**Young** 2002; **Banno** 2007; **McNicholas** 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Einflüsse des OSAS auf die arterielle Hypertonie und die pulmonale Hypertonie untersucht werden, weshalb diese Erkrankungen im Folgenden genauer erklärt werden (siehe Kapitel 1.2-1.4).

1.1.5 Therapie

Die Therapie des OSAS ist abhängig von mehreren Faktoren, wie Schwere der Erkrankung, AHI, Form und klinischen Symptomen (**S3-Leitlinie** 2009).

Wie bereits unter 1.1.3 beschrieben ist Adipositas ein wichtiger Risikofaktor für das OSAS, weshalb eine Gewichtsreduktion ein wichtiger begleitender Faktor für die Therapie darstellt (**Buchwald** 2004; **Schwartz** 2008).

Heutzutage stellt die nächtliche Überdruckbeatmung (CPAP; Continuous Positive Airway Pressure) den Goldstandard in der Behandlung des OSAS dar. Erstmals beschrieben wurde diese Methode 1981 von Sullivan et al (**Sullivan** 1981). Es ist ein nichtinvasives Verfahren, bei dem Druckluft über eine Gesichts- oder Nasenmaske in die oberen Atemwege gepumpt wird (**Prabhat** 2012). Die CPAP kann bei allen Schweregraden des OSAS angewendet werden. Dabei werden nicht nur die Atemaussetzer, die Tagesmüdigkeit und die Lebensqualität verbessert, sondern auch die Unfallneigung verringert (**Ayas** 2006; **Kushida** 2006). Inwieweit sich die Symptome verbessern ist allerdings abhängig von der Anwendungsdauer des Gerätes während des Schlafes (**Weaver** 2008).

Unerwünschte Nebeneffekte sind unter anderem Irritationen des Nasen- und Gesichtsgewebes, Mundtrockenheit und schmerzende Augen (**NHMRCA** 2000), was dazu führt, dass das Verfahren nicht von allen Patienten akzeptiert wird (**Somers** 2008).

Für Patienten mit einer leichten bis mittelschweren Form des OSAS, bei denen die CPAP-Therapie nicht zum Erfolg geführt hat oder die diese Art der Behandlung abgelehnt haben, ist die Unterkieferprotrusionschiene (UPS) eine Alternative (**Kushida** 2006). Die Aufgabe der Schiene ist es, den Unterkiefer möglichst weit vorne zu fixieren, um ein Zurückfallen der Zunge und der Muskelstrukturen in den Pharynx zu verhindern, wodurch die Atemwege mechanisch offengehalten werden. Das Schienensystem wird hierbei individuell von Zahnmedizinern nach den

Abdrücken des Patienten angepasst (**Schwarting** 2007), wobei neuere Daten darauf hindeuten, dass Zweischienensystemen gegenüber einer Schiene der Vorzug zu geben ist (**Rose** 2002; **Vanderveken** 2008).

Die positiven Auswirkungen der Anwendung solcher Schienen sind nicht so ausgeprägt wie unter CPAP-Therapie und abhängig von AHI, Alter, BMI und Geschlecht (**Ferguson** 2006; **Chan** 2008).

Nebenwirkungen dieser Therapie treten bei 6-86% der Patienten auf, darunter Hypersalivation, Mundtrockenheit und Abweichung der Kieferstellung (**Kushida** 2006; **Chan** 2008).

Des Weiteren gibt es operative Verfahren, welche sich wie folgt unterteilen lassen:

- resektive: Uvulopalatopharyngoplastik (UPPP), laserassistierte Uvulopalatoplastik (LAUP)
- nichtresektive: z.B. Weichgaumenimplantate, Radiofrequenzchirurgie
- Osteotomie: mandibulär, maxillo-mandibulär

Bei den resektiven Operationstechniken werden die Obstruktionen, die den normalen Luftfluss behindern, beseitigt. Zu einer Verbesserung der Symptome eines leichten- bis mittelgradigen OSAS kommt es bei der UPPP in 40-50% der Fälle (**Won** 2008). Mit der Zeit kann diese Verbesserung allerdings abnehmen (**Walker-Engström** 2002). Zusätzlich birgt diese Methode ein hohes peri- und postoperatives Risiko sowie die Gefahr von unerwünschten Nebeneffekten, wie z.B. Stimmveränderungen und Schluckbeschwerden (**Won** 2008). Die LAUP hat nur eine geringe Erfolgsaussicht und führt häufig zu Nebenwirkungen, weshalb dieses Verfahren nicht empfohlen wird (**Won** 2008).

Walker et al. beschreiben in einer Studie von 2006, dass die meisten Patienten, die zu Beginn der Therapie mittels Weichgaumenimplantaten eine Verbesserung der Symptome zeigten, diese über den Beobachtungszeitraum von 90 Tagen beibehalten haben (**Walker** 2007). So kann diese Behandlungsart bei einigen Personen mit gering- bis mittelgradiger Schlafapnoe eine minimalinvasive Alternative darstellen.

Wenn kraniofaziale Besonderheiten vorliegen können auch Osteotomien von Ober- und Unterkiefer eine wichtige Therapieart darstellen (**Boudewyns** 2007). Hierbei unterscheidet man die mandibuläre Osteotomie mit einer Responderrate von 35-60% (**Won** 2008) und das maxillo- mandibuläre Advancement, welches in 90-100% der

Fälle zu einer Verbesserung der Symptome führt (**Conradt** 1997; **Hochban** 1997; **Prinsell** 1999; **Riley** 2000).

Als letztes operatives Verfahren sei noch die Tracheotomie genannt, die zwar die Obstruktion zuverlässig beseitigt, jedoch aufgrund der Begleiterscheinungen nur als Ultima Ratio für Personen, bei denen alle anderen Therapiearten keinen Erfolg gebracht haben, anzusehen ist (**Won** 2008).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die operativen Verfahren zwar einen gewissen Erfolg in der Behandlung des OSAS zeigen, jedoch jede Operation ein Risiko birgt, weshalb diese Behandlungsart nicht als primäre Therapie in Betracht gezogen werden sollte (**Sundaram** 2005; **Lin** 2008; **Franklin** 2009).

Für den Therapieerfolg durch eine medikamentöse Behandlung des OSAS gibt es nur unzureichende Beweise. Eine medikamentöse Therapie ist sinnvoll bei Patienten, die aufgrund einer anderen Grunderkrankung (z.B. Akromegalie oder Hypothyreose) an Schlafapnoe leiden, allerdings wird hierdurch das OSAS nicht immer komplett geheilt (**Smith** 2006; **S3-Leitlinie** 2009).

1.2. Arterielle Hypertonie des Menschen

1.2.1 Definition und Klassifikation

Die arterielle Hypertonie ist ein Krankheitsbild, das durch eine chronische Erhöhung des Blutdruckes auf Werte $>140\text{mmHg}$ (systolisch) und $>90\text{mmHg}$ (diastolisch) charakterisiert ist (**Pschyrembel** 2001). Laut World Health Organisation (WHO) sind mehrere Einteilungen möglich. Die Unterscheidung nach der Ursache ist eine Möglichkeit das Krankheitsbild der arteriellen Hypertonie zu differenzieren. Eine primäre (essentielle) Hypertonie liegt vor, wenn der Erkrankung keine eindeutige Ätiologie zugrunde liegt. Ist die zur Hypertonie führende Krankheit jedoch bekannt, so wird dies als sekundäre Hypertonie bezeichnet (Tabelle 1.1.4).

I10-I15 Hypertonie [Hochdruckkrankheit]

Exkl.:

Als Komplikation bei Schwangerschaft, Geburt oder Wochenbett (O10-O11, O13-O16)
Hypertonie beim Neugeborenen (P29.2)
Mit Beteiligung der Koronargefäße (I20-I25)
Pulmonale Hypertonie (I27.0)

Info.:

I10.- Essentielle (primäre) Hypertonie
I11.- Hypertensive Herzkrankheit
I12.- Hypertensive Nierenkrankheit
I13.- Hypertensive Herz- und Nierenkrankheit
I15.- Sekundäre Hypertonie

Tabelle 1.1.4: Einteilung der Hypertonie nach ICD-10 (ICD-10 online, WHO-Version 2013 (**Krollner** 2013b))

Eine weitere Unterscheidung des Krankheitsbildes kann auf Grundlage der Höhe des Blutdruckes erfolgen (Tabelle 1.1.5).

Kategorie	systolisch (mmHg)	diastolisch (mmHg)
optimaler Blutdruck	< 120	< 80
normaler Blutdruck	120–129	80–84
hoch-normaler Blutdruck	130–139	85–89
milde Hypertonie (Stufe 1)	140–159	90–99
mittlere Hypertonie (Stufe 2)	160–179	100–109
schwere Hypertonie (Stufe 3)	> 180	> 110
isolierte systolische Hypertonie	> 140	< 90

Tabelle 1.1.5: Einteilung der Hypertonie nach Höhe des Blutdrucks (**S2-Leitlinie** 2008)

Die Einteilung nach Endorganschäden stellt eine dritte Möglichkeit der Klassifikation dar (**Pschyrembel** 2001).

- WHO-Grad I: keine Schäden von Herz, Niere und Gehirn, normaler Augenhintergrund
- WHO-Grad II: Schädigung an Herz, Niere oder Gehirn, Augenhintergrundveränderungen
- WHO-Grad III: Schädigung mehrerer Organe, schwere Augenhintergrundveränderungen

1.2.2 Arterielle Hypertonie und Herzerkrankungen

Um einer erhöhten Nachlast aufgrund einer Hypertonie entgegenzuwirken, stehen dem Herzen eine Reihe von Adaptationsmechanismen zur Verfügung. Auf eine gesteigerte Nachlast initiiert das Herz einige Kompensationsmechanismen, darunter die Aktivierung des Sympathikus und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) sowie als längerfristiger Kompensationsmechanismus die konzentrische Hypertrophie, die als Folge einer Zunahme der Wandstärke entsteht. Die Aktivierung des RAAS und des Sympathikus führt zu einer Vasokonstriktion mit nachfolgender Blutdruckerhöhung, ebenso wie zu einer Steigerung der Herzfrequenz und der Kontraktilität. Bleibt die Ursache für die Belastung des Herzens längerfristig bestehen, so vermag dieses dieser Anforderung nicht mehr standzuhalten, was in einer pathologischen Hypertrophie resultiert (**Schneider** 2008; **Bernardo** 2010).

Aufgrund dieser Vorgänge kann Bluthochdruck zu einer linksventrikulären Hypertrophie führen, die in einer systolischen und nachfolgend auch in einer diastolischen Einschränkung der Herzfunktion mit anschließender Herzinsuffizienz gipfeln kann. Somit ist die Linksherzhypertrophie für Patienten mit arterieller Hypertonie ein entscheidender Faktor für Morbidität und Mortalität (**Verdecchia** 1998; **Rabkin** 2012).

Weiterhin gibt es eine wichtige Verbindung von Bluthochdruck und koronarer Herzerkrankung. Eine Erhöhung des Blutdruckes erhöht das Risiko von Nierenerkrankungen, Hirnschlag, Herzinfarkt und Herzinsuffizienz (**Chalmers** 1999; **JNC-7-Guidelines** 2004).

Zusätzlich ist die arterielle Hypertonie entscheidend an der Entstehung von Arteriosklerose und den daraus resultierenden Folgen, darunter Angina pectoris, Myokardinfarkt oder Herztod beteiligt (**Khaleghi** 2009).

1.2.3 Therapie

Ziel der Therapie ist es, den Blutdruck über einen längeren Zeitraum auf <140/90mmHg zu senken und damit das kardiovaskuläre Risiko langfristig zu verringern. Eine Erniedrigung des Blutdruckes auf <130/80mmHg empfiehlt sich bei Menschen die unter Diabetes mellitus oder einer Niereninsuffizienz leiden. Zusätzlich zu der medikamentösen Behandlung mit Antihypertensiva empfiehlt sich eine Umstellung der Lebensgewohnheiten (z.B. Gewichtsreduktion, Ausdauertraining).

Leidet der Patient unter einer sekundären Hypertonie so sollte die Behandlung der zugrundeliegenden Erkrankung im Vordergrund stehen (**Huber** 2011).

1.3 Pulmonale Hypertonie des Menschen

1.3.1 Definition und Klassifikation

Unter der Bezeichnung pulmonaler Hypertonie (PH) werden mehrere Erkrankungen multifaktorieller Ursachen, die durch einen Anstieg des Gefäßwiderstandes der Lungenstrombahn und durch eine Erhöhung des arteriellen Druckes charakterisiert sind, zusammengefasst. Entscheidend für diese Veränderungen sind Erkrankungen des Herzens (Linksherzversagen, Klappenanomalien) und der Lunge (COPD, Hypoxie), ebenso wie Umbauvorgänge an den Lungengefäßen (Obstruktion der kleinen Pulmonalarterien, Gefäßproliferation und -remodeling). Als Konsequenz der PH kann es aufgrund der Erhöhung der Nachlast zu einer Rechtsherzhypertrophie kommen, die bei einer starken chronischen Belastung in einem Cor pulmonale mit terminaler rechtsventrikulärer Dekompensation gipfeln kann (**Rosenkranz** 2007).

Zur Sicherung der Diagnose ist heutzutage die Rechtsherzkatheterisierung mit Bestimmung des mittleren pulmonalarteriellen Druckes (PAPm) die Methode der Wahl. Wird ein PAPm von $\geq 25\text{mmHg}$ in Ruhe festgestellt, so spricht man von einer klinisch manifesten PH (**Hoeper** 2009; **Jonigk** 2012).

Man kann davon ausgehen, dass etwa 100 Millionen Menschen weltweit an einer der PH-Varianten erkrankt sind (**Schermuly** 2011). Da die Erkrankung immer weiter an Bedeutung gewonnen hat fand 1971 eine erstmalige Klassifikation der PH durch die WHO statt. Seitdem wurde diese Einteilung dreimal abgeändert. Die momentan gültige Fassung ist die im Jahre 2008 bei der Weltkonferenz in Dana Point (Kalifornien) modifizierte Klassifikation (**Simonneau** 2009) (s. Tab. 1.1.6). Im Februar 2013 fand eine fünfte Konferenz in Nizza statt.

1. Pulmonal arterielle Hypertonie (PAH)

- 1.1 Idiopathische PAH (IPAH)
- 1.2 Hereditär (HPAH)
 - 1.2.1 BMPR2
 - 1.2.2 ALK1, Endoglin (mit/ohne hereditärer hämorrhagischer Teleangiectasie)
 - 1.2.3 Unbekannt
- 1.3 Medikamenten-/Drogenassoziiert
- 1.4 PAH assoziiert mit:
 - 1.4.1 Kollagenosen
 - 1.4.2 HIV-Infektion
 - 1.4.3 Portaler Hypertonie
 - 1.4.4 Angeborenen Herzfehlern
 - 1.4.5 Schistosomiasis
 - 1.4.6 Chronisch-hämolytischer Anämie
- 1.5 Persistierende pulmonale Hypertonie der Neugeborenen

1' Pulmonale venookklusive Erkrankung und/oder pulmonal kapilläre Hämangiomatose

2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankung

- 2.1 Systolische Funktionsstörungen
- 2.2 Diastolische Funktionsstörungen
- 2.3 Herzklappenerkrankungen

3. Pulmonale Hypertonie in Verbindung mit Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie

- 3.1 Chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen
- 3.2 Interstitielle Lungenerkrankungen
- 3.3 andere Lungenerkrankungen mit gemischten restriktiv-obstruktiven Mustern
- 3.4 Schlafapnoe-Syndrom
- 3.5 Erkrankungen mit alveolärer Hypoventilation
- 3.6 Chronischer Aufenthalt in Höhenlagen
- 3.7 Pulmonale Entwicklungsstörungen

4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie

5. Pulmonale Hypertonie bei unklaren multifaktoriellen Mechanismen

- 5.1 Hämatologische Erkrankungen: Myeloproliferative Störungen, Splenektomie
- 5.2 Systemische Störungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhans Zell Histiozytose, Lymphangioleiomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis
- 5.3 Metabolische Erkrankungen (Glykogenspeicherkrankheit, M. Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen)
- 5.4 andere: Kompression der Pulmonalgefäße durch Tumore, fibrosierende Mediastinitis, dialysepflichtige chronische renale Insuffizienz

Tabelle 1.1.6: Einteilung der pulmonalen Hypertonie [Dana Point Klassifizierung, 2008 (Simonneau 2009)]

Zusätzlich wird unterschieden, ob postkapilläre oder präkapilläre Ursachen zur Entstehung der Erkrankung beigetragen haben. Patienten mit postkapillärer PH (Gruppe 2) entwickeln aufgrund einer primären Linksherzerkrankung eine

pulmonalvenöse Stauung mit einhergehender Erhöhung des kapillären und pulmonalarteriellen Druckes (PAP), wohingegen bei der präkapillären Form (Gruppe 1,3,4,5) eine Erhöhung des PAP bei normalem kapillären Druck zu finden ist (**Galiè** 2009).

1.3.2 Pathophysiologie

Die Pathogenese der PH ist multifaktoriell und abhängig von der zugrunde liegenden Primärerkrankung. Sie umfasst jedoch das vaskuläre Remodeling, die Vasokonstriktion, die In-situ-Thrombosen der Pulmonalgefäße und die Entstehung der persistierenden oder intermittierenden alveolären Hypoxie (**Olschewski** 1994; **Stenmark** 2006b).

Als vaskuläres Remodeling wird der strukturelle und funktionelle Umbauprozess der pulmonalen Gefäße bezeichnet. Dabei kommt es zu Veränderungen aller drei Schichten der Gefäßwand (Intima-Media-Adventitia). In der innen gelegenen Intima, die aus der Lamina elastica interna und dem Endothel zusammengesetzt ist, entsteht aus Myofibroblasten und extrazellulärer Matrix eine Neointima, welche ein typisches Merkmal für die humane PAH ist. Weiterhin kann es durch Endothelzellproliferation und plexiforme Läsionen zur Obstruktion des Lumens kommen (**Humbert** 2004; **Schermuly** 2011).

Charakteristisch für die Veränderungen der Media ist die Mediahypertrophie sowie die De-novo-Muskularisierung, die durch Einwandern von Myofibroblasten der Adventitia in nichtmuskularisierte kleinere Gefäße entsteht (**Stenmark** 2006a). Des Weiteren kommt es in der äußeren Adventitia zu einer Aktivierung der Fibroblasten mit anschließender Proliferation und Migration in die Zellwand sowie zu einer Verdickung aufgrund von Kollagenablagerungen (**Tuder** 2007; **Matthys** and **Seeger** 2008).

Somit sind die Folgen des Remodelings eine Verringerung der Compliance (Volumendehnbarkeit), entstanden durch die Veränderung der großen Arterien sowie eine Erhöhung der Resistance (Gefäßwiderstand), die durch den Umbau der kleinen Lungengefäße hervorgerufen werden, was beides zu einer massiven Belastung des rechten Ventrikels führt (**Stenmark** 2006b; **Schermuly** 2011).

Eine In-situ-Thrombose kann durch eine Dysfunktion der Gerinnungskaskade, des Endothels oder der Thrombozyten hervorgerufen werden. Im Rahmen einer PH kommt es zur Funktionsänderung der Endothelzellen, die mit einer erhöhten Abgabe gerinnungsfördernder Substanzen (z.B. Fibrinopeptid A und D, von Willebrand Faktor) einhergeht. Zusätzlich begünstigen die durch den erhöhten Gefäßwiderstand entstandenen Scherkräfte das Anlagern der Thrombozyten an die thrombogene Oberfläche, was zu einer erhöhten Aggregationsneigung und damit zu einer erhöhten Thrombosegefahr führen kann (**Humbert** 2004; **Schermuly** 2011).

Der alveolären Hypoxie können nicht nur Erkrankungen mit obstruktiven Prozessen, sondern auch extrapulmonale Ursachen (z.B. Thoraxdeformation, Bewohner großer Höhen) zugrunde liegen (**Matthys** and **Seeger** 2008). Die pulmonale präkapillare Vasokonstriktion ist ein physiologischer Adaptationsmechanismus, der bewirkt, dass das Blut von schlecht ventilierten zu gut ventilerten Regionen umgeleitet wird, um somit die bestmögliche Sauerstoffaufnahme zu gewährleisten (**Mandegar** 2004).

Dabei läuft die Vasokonstriktion in 3 Phasen ab (**Weissmann** 2001; **Sommer** 2008):

1. Die akute hypoxische Reaktion innerhalb von Sekunden,
2. eine anhaltende, protrahierte hypoxische Antwort über eine Zeit von Minuten bis Stunden und
3. die chronische Hypoxie mit vaskulärem Remodeling und PH.

1.3.3 Therapie

Die heutige Therapiestrategie der PH greift vor allem in die Regulation des Gefäßtonus ein.

- Prostazyklinanaloga (Epoprostenol, Iloprost, Trepostenil und Beraprost) wirken als Vasodilatoren und haben einen zusätzlichen antiproliferativen Effekt auf glatte Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten.
- Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitoren (Sildenafil, Tadalafil) sind Vasodilatoren, die auf den NO-Signaltransduktionsweg einwirken und den Abbau von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) hemmen.
- Endothelin-1-Rezeptor Antagonisten (Bosentan, Sitasentan, Ambrisentan) greifen hemmend in die Vasokonstriktion und Fibroblastenproliferation ein (**Humbert** 2008).

Zusätzlich ist es möglich, die oben aufgeführten Wirkstoffe zu kombinieren, wodurch die klinische Wirkung der einzelnen Therapiemethoden summiert wird (**Humbert 2009**).

Auch die Gabe von Antikoagulantien, Diuretika und inhalativem Sauerstoff ist Teil der Therapie sowie ein moderates körperliches Training, welches positive Effekte auf die Lebensqualität haben kann (**Rosenkranz 2007**).

Kann die medikamentöse Therapie das Voranschreiten der Erkrankung nicht aufhalten, so müssen invasive Therapiemethoden (atriale Septostomie, Lungen- oder Herz-Lungentransplantation, Implantation eines Right Ventricular Assist Device (RVAD)) in Betracht gezogen werden (**Rosenkranz 2007; McLaughlin 2009**).

Trotz dieser Therapiemaßnahmen ist es bisher nicht möglich die Erkrankung zu heilen. Deshalb wird beständig an neuen Behandlungsmethoden bzw. potentiellen Zielproteinen geforscht, darunter Elastase, Guanylatzyklase (Riociguat), Tyrosinkinase (Imatinib), Serotoninrezeptoren, und Rho-Kinasen (**Schermuly 2008**).

1.4 Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom und Komorbiditäten

1.4.1 Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom und arterielle Hypertonie

Wichtig für die Entstehung der arteriellen Hypertonie, als Komorbidität des OSAS, ist die intermittierende Hypoxie, welche repetitive Hypoxiephasen mit nachfolgender Reoxygenierung erzeugt und somit die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) und die Aktivierung der Entzündungskaskade begünstigt. Dies kann die Funktion des Endothels schwächen und somit zur endothelialen Dysfunktion, die durch ein Ungleichgewicht in der Produktion von Vasokonstriktoren und Vasodilatoren gekennzeichnet ist, führen. Zusätzlich kann diese Entwicklung durch den negativen intrathorakalen Druck und die Schlafunterbrechung mit Aktivierung des Sympathikus und einhergehendem Arousal noch begünstigt werden. Als Konsequenz kann es zur Erhöhung des Gefäßtonus und Versteifung der Arterien kommen, was das Risiko einer arteriellen Hypertonie verstärkt (**Somers 2008; Pack 2009; Zhang 2012a**).

Sowohl das OSAS als auch arterielle Hypertonie sind weitverbreitete Erkrankungen. Die Prävalenz der an dem Schlafapnoe-Syndrom und Bluthochdruck erkrankten Menschen beträgt ungefähr 50%, wobei schätzungsweise weitere 30% unter OSAS leiden, aber dahingehend noch nicht diagnostiziert wurden (**Somers 2008**).

Bei gesunden Menschen ist der Blutdruck einem zirkadianen Rhythmus unterworfen. Hierbei fällt der Blutdruck während des Schlafes 10-20% vom Tageswert ab und steigt sofort nach dem Aufwachen wieder an. Dieser Blutdruckabfall in der Nacht wird auch als „Dipping“ bezeichnet. Menschen, die während des Schlafes keine Verringerung des Blutdruckes vom Tageswert zeigen oder bei denen der Wert über den Blutdruck in der Wachphase steigt werden „Non-dipper“ genannt und können ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen haben (**Banno** 2007). Eine Studie von Loreda et al. zeigte, dass die Prävalenz des non-dippings bei unbehandelten Patienten mit leichtem bis schwerem OSAS sehr hoch war, jedoch die Schlafqualität nicht davon beeinflusst war (**Loreda** 2001). Des Weiteren war bei einer 24-stündigen Blutdruckmessung von OSAS Patienten ein ähnliches nächtliches Blutdruckprofil zu sehen wie bei non-dipping Patienten, die unter arterieller Hypertonie leiden (**Zhang** 2012a).

In mehrere Studien wurde zwischen 1997 und 2001 untersucht, ob es eine Verknüpfung zwischen dem AHI und Bluthochdruck gibt, die unabhängig von den bekannten Variablen (Geschlecht, Alter, Gewicht) ist. Dabei zeigte sich, dass es eine Verbindung zwischen OSAS und Hypertonie gibt, diese jedoch verstärkt bei jüngeren, weniger adipösen Menschen, als bei älteren, übergewichtigen Patienten auftritt (**Young** 1997; **Young** 2002).

Dies bestätigte auch eine Untersuchung von Nieto, bei der der systolische und diastolische Blutdruck signifikant mit dem Schweregrad des OSAS anstieg. Diese Entwicklung ging ebenfalls mit einer erhöhten Prävalenz der arteriellen Hypertonie einher. Allerdings konnten auch hierbei einige Veränderungen anhand BMI-Unterschieden erklärt werden (**Nieto** 2000).

Auch für die Entwicklung einer essentiellen Hypertonie spielt das OSAS eine wesentliche Rolle. Das Krankheitsbild der essentiellen Hypertonie ist charakterisiert durch einen Blutdruck $\geq 140/90$ mmHg bei Gabe von ≥ 3 Medikamenten. Patienten, die unter dieser Erkrankung leiden, weisen eine Prävalenz für das OSAS von 83% auf (**Logan** 2001).

Anhand der Daten mehrerer Studien konnte gezeigt werden, dass das Schlafapnoe-Syndrom ein Risikofaktor für die Entstehung der arteriellen Hypertonie mit daraus folgender kardiovaskulärer Sterblichkeit ist (**Carlson** 1994; **Maekawa** 1998; **Peppard** 2000; **Schulz** 2000a) und dass die Therapie mit CPAP eine klinisch relevante

Senkung des Blutdruckes zur Folge hat (**McNicholas** 2007). Dieser Effekt ist nicht immer gleich ausgeprägt, lässt jedoch die Vermutung zu, dass Patienten mit einer schweren Form des OSAS und essentieller Hypertonie sowie einer guten CPAP-Adhärenz deutlich von dieser Behandlungsmethode profitieren (**Bazzano** 2007; **Somers** 2008).

1.4.2 Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom und pulmonale Hypertonie

Ein wichtiger Faktor für die Entstehung einer OSAS-abhängigen PH ist die alveolare Hypoxie, welche durch Vasokonstriktion der kleinen Lungengefäße zu einer Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes führen kann (**Hawrylkiewicz** 2004). Allerdings ist man nicht sicher, ob nächtliche alveolare Hypoxie eine in den Tagesstunden sichtbare PH hervorrufen kann, oder ob dazu auch Hypoxiephasen am Tage, wie sie bei übergewichtigen Menschen und Patienten, die unter einer Herz- oder Lungenerkrankung leiden vorkommen, notwendig sind (**Kessler** 1996; **Somers** 2008). Eine Studie von Sajkov et al. zeigte, dass einige OSAS-Patienten ohne weitere Lungenerkrankung eine PH entwickelten, die nicht mit dem Schweregrad des Schlafapnoe-Syndroms zusammenhing. Weiterhin führten sie an, dass es durch den Verschluss der Atemwege während des Atmens und durch den erhöhten Lungendruck unter Hypoxie zu einem Remodeling der Lungengefäße kommen kann (**Sajkov** 1999).

Zusätzlich hat Hypoxie eine negative Wirkung auf die Funktion des Endothels, was ebenfalls zu einem Remodeling der Gefäße führen kann (**Faller** 1999).

Chaouat fand nur in 20% der Teilnehmer seiner Studie eine OSAS-bezogene PH (**Chaouat** 1996) und hierbei auch hauptsächlich eine moderate Form (PAPm von 25-35mmHg), was auch der Klassifizierung dieser PH unter Gruppe 3 entspricht (**Simonneau** 2009; **Fukumoto** 2011). Die unterschiedlichen Studien zur PH sind in Tabelle 1.1.7 aufgeführt.

Autor/Jahr	Prävalenz PH (%)	Mittlerer PAP (mmHg)	Einschluss von Patienten mit COPD/OHS
Podszus/1986	20	29	?
Weitzenblum/1988	20	23	+
Krieger/1989	19	30	+
Laks/1995	42	29	+
Chaouat/1996	17	26	+
Sanner/1997	20	22	-
Sajkov/1999	34	24	-
Nijima/1999	53	29	+
Bady/2000	27	29	-
Alchantis/2001	21	26	-
Yamakawa/2002	22	?	-

Tabelle 1.1.7: Prävalenz der PH bei Patienten mit OSAS (**Schulz** 2005).

PAP= pulmonalarterieller Druck, COPD= chronisch-obstruktive Lungenerkrankung,
OHS= Obesitas-Hypoventilationssyndrom

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine milde Form der PH eine Begleiterscheinung des OSAS ist, die auch ohne Herz- oder Lungenerkrankungen entwickelt werden kann. Gründe für die Entstehung einer PH sind eine Vasokonstriktion der Lungengefäße aufgrund eines erhöhten Gefäßtonus, endothelialer Dysfunktion und Gefäßremodeling (**Fagan** 2001a; **Sajkov** 2002). Eine CPAP-Therapie hat auch bei der PH positive Effekte auf das Lungen- und kardiovaskuläre Gefäßsystem, da es sowohl den pulmonalarteriellen, als auch den diastolischen Druck verringert (**Alchanatis** 2001; **Sajkov** 2002).

1.5 Experimentelle Tiermodelle

Wie bereits unter 1.1.4 beschrieben sind die mit dem OSAS einhergehenden Erkrankungen vielfältig und bisher sind die Mechanismen, die diese miteinander verbinden, noch nicht geklärt.

Des Weiteren steht momentan noch keine medikamentöse Therapie zur Behandlung des OSAS zur Verfügung, außer es liegt eine andere Grunderkrankung wie Akromegalie oder Hypothyreose vor. Die zurzeit verfügbaren Behandlungsmethoden führen zwar zu einer Verbesserung der Symptome, jedoch ist darunter keine Therapie, die von allen Patienten akzeptiert wird und die die Ursachen der Entstehung der Herz-Kreislauf-Erkrankung, die schließlich die wesentliche Todesursache ist, beseitigt (**Veasey** 2006).

Aus diesen Gründen besteht hinsichtlich der Pathogenese und der Therapie des OSAS und seiner Folgeerkrankungen noch erheblicher Forschungsbedarf.

1.5.1 Mausmodell der chronisch intermittierenden Hypoxie

Je nach Tiermodell gibt es unterschiedliche Ansätze, um die pathophysiologischen Vorgänge des OSAS beim Menschen nachzustellen, darunter Tiere mit spontaner OSA (englische Bulldogge), ein mechanischer Verschluss der Atemwege, intermittierende Hypoxie und Schlafapnoe (**Jun** 2007; **Dematteis** 2009).

Bei englischen Bulldoggen und anderen brachyzephalen Hunderassen gibt es anatomische Veränderungen, die zu Schnarchen, Hypopnoe und Arousal führen können, weswegen diese Hunderassen ein „natürliches“ Tiermodell darstellen (**Hendricks** 1987). Weiterhin zeigte eine Studie von Philip et al., dass Affen nach einer Kollageninjektion in die Uvula, Zunge und den Pharynx schlafbezogene Atemstörungen und Schlafstörungen entwickeln können, wie sie auch in OSAS Patienten vorhanden sind (**Philip** 2005).

Als Limitation dieser OSAS-Simulation gilt, dass metabolische Vorgänge aufgrund von Lücken in der Charakterisierung des Phäno- und Genotyps nicht oder nur schwer untersucht werden können (**Jun** 2007).

Ein mechanischer Verschluss der oberen Atemwege wurde bei schlafenden Schweinen (**Chen** 2000), Ratten (**Farre** 2003) und Hunden (**Kimoff** 1994) durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie dem beim Menschen vorkommenden OSAS durch den Verschluss der Atemwege sehr ähnlich ist. Allerdings ist dieses Modell technisch sehr aufwendig, was die Untersuchung einer großen Tieranzahl erschwert (**Jun** 2007).

Eine weitere Methode zur Nachstellung des OSAS ist die Schlaffragmentierung. Hierbei wurden Hunde (**Brooks** 1997) oder Mäuse (**Polotsky** 2006) mittels Polysomnographie überwacht und nach einer vorgegebenen Schlafzeit durch einen taktilen oder akustischen Reiz geweckt. Eine Unzulänglichkeit dieser Methode ist die Unsicherheit, ob der Reiz nach einer gewissen Zeit noch eine effektive Weckreaktion auslöst sowie das Problem, dass die Arousals bei diesem Modell langfristig nicht reproduzierbar sind (**Jun** 2007).

Die am besten beschriebene Methodik zur Simulation des OSAS ist die der chronisch intermittierenden Hypoxie (CIH). Der Ansatz zur Erzeugung der pathophysiologischen Vorgänge ist hierbei nicht die Obstruktion, sondern die daraus resultierende CIH, die einen der wichtigsten Faktoren in der Pathogenese des OSAS und in der Entstehung der kardiovaskulären Erkrankungen darstellt (**Jun** 2007; **Reinke** 2011; **Zhang** 2012a). Dieses Modell wird hauptsächlich bei Nagetieren verwendet: Eines der ältesten Modelle ist das 1992 von Fletcher et al. entwickelte System für Ratten (**Fletcher** 1992). Bei dieser Methode wird über ein Kontrollsystem Stickstoff, Sauerstoff oder Raumluft in eine verschlossene Kammer geleitet. Man unterscheidet zwischen zwei Varianten, dem schlafabhängigen, und dem schlafunabhängigen Modell. Bei dem schlafabhängigen Modell, das von Tagaito et al. entwickelt wurde, kam die CIH nur während der Schlafphase zum Einsatz, was über ein Elektroenzephalogramm oder ein Elektromyogramm kontrolliert wurde (**Tagaito** 2001). Dahingegen werden bei der zweiten Variante Tiere der CIH ohne Rücksicht auf ihre Wach/Schlafphase ausgesetzt. Meistens erfolgt die CIH-Exposition jedoch am Tag und die Tiere verbleiben während der Dunkelphase in Normoxie. Die Dauer und der Schweregrad der CIH variieren zwischen 30 und 120 Sekunden Hypoxie sowie zwischen einer Sauerstoffkonzentration von 3-10% (**Jun** 2007; **Drager** 2010).

In vielen Studien wurde bereits gezeigt, dass Tiere, die der CIH ausgesetzt waren, Symptome entwickelten, die denen des OSAS beim Menschen ähnlich sind. Somit eignet sich diese Methode für die Erforschung metabolischer und kardiovaskulärer Folgeerkrankungen, die mit dem Schlafapnoe-Syndrom des Menschen einhergehen (**Campen** 2005; **Jun** 2007).

Zusätzlicher Vorteil bei der Verwendung von Mäusen im Tiermodell sind neben Kostengründen (hohe Reproduktionsrate, geringer Platzbedarf, niedrige

Haltungskosten) insbesondere die Möglichkeit, knockout- oder gegenüberexprimierende-Tiere zu verwenden, da das Genom der Maus vollständig entschlüsselt ist.

1.6 Die NO-Synthase

Die Aufgabe des Enzymes Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase) ist es, die NADPH- und O₂-abhängige Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und NO zu katalysieren. Als Kofaktoren für diese Reaktion sind Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN), Tetrahydrobiopterin (BH₄) und Häm entscheidend. Bis heute wurden drei Isoformen der NO-Synthase identifiziert, die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS1), die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS2) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS3). Die nNOS wird konstitutiv exprimiert und kommt in Neuronen, im Skelettmuskel und in Epithelzellen vor. Diese Isoform ist Kalzium/Calmodulin-abhängig, wird allerdings im Gehirn durch Agonisten des N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA) Rezeptors aktiviert. Ebenfalls eine konstitutiv exprimierte Isoform ist eNOS, die im Gefäßendothel, in Neuronen, in Epithelzellen und in Kardiomyozyten zu finden ist. Hierbei ist sie in spezifischen Einbuchtungen der Plasmamembran, den sogenannten „Caveolae“, lokalisiert. Diese Lokalisation und Aktivität von eNOS in der Zelle ist von Kalzium/Calmodulin abhängig, was auch posttranslationale Veränderungen wie Phosphorylierung und Myristoylierung mit einschließt. Auch eine Erhöhung der Blutflussrate, die mit Scherkräften (shear stress) einhergeht, führt aufgrund der Phosphorylierung von eNOS zu einer gesteigerten NO-Synthese (**Balligand** 2009; **Hill** 2010).

Sowohl die nNOS als auch die eNOS haben nur eine geringe NO-Produktion zur Folge (nanomolare Menge), die aber ausreichend ist, um den Gefäßtonus aufrechtzuerhalten, die Zellproliferation zu kontrollieren sowie die Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel und die Thrombozytenaggregation zu verhindern.

Die dritte Isoform iNOS ist weder Kalzium- noch Calmodulin-abhängig und wird in vielen Zelltypen als Antwort auf inflammatorische Reize durch Endotoxine und Cytokine (IL-1, IL-2, TNF α , IF γ) exprimiert. Diese Isoform produziert toxische Mengen (in micromolaren Konzentrationen) NO solange der Reiz vorhanden ist (**Dias-Junior** 2008; **Hill** 2010).

Das durch die NO-Synthase gebildete NO ist ein freies Radikal, das über zwei Mechanismen stabilisiert werden kann. Zum einen durch die Verbindung mit einem weiteren unpaaren Elektron oder zum anderen durch die Verknüpfung mit Eisen (**Hill** 2010).

Physiologischerweise diffundiert NO in die Zielzelle und bindet sich dort aufgrund seiner Affinität zu Eisen an das Häm der löslichen Guanylatcyclase (sGC). Dies führt zur Aktivierung der sGC, was die Synthese des second messenger zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) zur Folge hat, welcher wiederum die cGMP-Kinase aktiviert. Dies bewirkt einen vermehrten Ca^{2+} -Ausstrom aus der Zelle, wodurch der intrazelluläre Kalziumgehalt abnimmt, was zur Vasodilatation und damit zur Relaxation der Muskelzelle führt. Dieser Effekt wird durch den Abbau von cGMP durch Phosphodiesterasen (PDE) beendet (**Ghofrani** 2004).

Für die Synthese von vaskulärem NO ist hauptsächlich eNOS verantwortlich. Bei Erkrankungen wie arterieller Hypertonie, Hypercholesterinämie oder Diabetes mellitus kann es zur NO-Inaktivierung, zur Oxidation von BH_4 sowie zu Änderungen des Redoxstatus der Zelle kommen, welche auf eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species ROS) zurückzuführen sind. Dabei reagiert NO mit dem von der NADPH-Oxidase stammenden Radikal Superoxid (O_2^-) zu Peroxynitrit, das Endorganschäden erzeugen kann. Diese Vorgänge führen zur NOS-Entkopplung und damit zur endothelialen Dysfunktion, wodurch NOS von einem vasoprotektiven zu einem gefäßschädigenden, superoxidproduzierenden Enzym wird. Somit sind diese Mechanismen entscheidend für die Pathogenese von Bluthochdruck, Arteriosklerose und anderen Herz-Kreislauf-erkrankungen (**Rösen** 2002; **Förstermann** 2006; **Zhang** 2007b; **Paravicini** 2008; **Zhang** 2012b).

1.6.1 NO-Synthase und das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom

Die Ergebnisse vieler Studien weisen darauf hin, dass die Produktion von ROS sowie die endotheliale und die induzierbare NO-Synthase eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von OSAS und den damit einhergehenden Herz-Kreislauf-erkrankungen spielt.

So kann schon bei einer milden Form des OSAS eine reduzierte Endothel-abhängige Vasodilatation beobachtet werden, die sich mit zunehmendem Schweregrad verschlechtert. Zudem zeigten OSAS Patienten eine verringerte NO Konzentration im

Plasma, die sich unter CPAP Therapie wieder normalisierte (**Ip** 2000; **Schulz** 2000b; **Zhang** 2012a).

Eine Studie von Greenberg et al. beschrieb im Herzgewebe von Mäusen, die der CIH ausgesetzt waren, eine Aktivierung des nuclear Faktor-kappaB (NF- κ B) sowie eine deutliche Erhöhung der Aktivität von NF- κ B in OSAS Patienten, die unter CPAP Therapie reduziert war. Diese Erhöhung des NF- κ B kann durch die gesteigerte Expression von iNOS erklärt werden, welches ein wichtiges NF- κ B-abhängiges, inflammatorisches Protein darstellt (**Greenberg** 2006).

Weiterhin fanden Patt et al. in Schlafapnoepatienten ohne Herz-Kreislauf-erkrankung eine erhöhte ROS-Produktion sowie eine endotheliale Dysfunktion, verursacht durch eine verminderte NO-Verfügbarkeit und eine transkriptionale Hochregulation der eNOS (**Patt** 2010).

Andere Ergebnisse brachte die Studie von Jelic et al., bei der ebenfalls Patienten ohne Herz-Kreislauf-erkrankung untersucht wurden. Auch hier wurde erhöhter oxidativer Stress, welcher mit einer verminderten NO-Verfügbarkeit einherging, festgestellt. Als Unterschied zu der Studie von Patt et al. zeigte sich hier bei den Patienten mit dem höchsten AHI eine geringere transkriptionale und posttranskriptionale eNOS-Expression. Außerdem wurde eine erhöhte iNOS-Expression beobachtet, was darauf hinweist, dass das OSAS begünstigend auf die Entstehung von Entzündung und oxidativen Stress wirkt und somit Auswirkungen auf das Gefäßendothel hat (**Jelic** 2008).

1.6.2 Gendefiziente (knockout) Mäuse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eNOS und iNOS knockout (KO) Mäuse untersucht.

1.6.2.1 iNOS KO Mäuse

Die Entwicklung von iNOS^{-/-} Mäusen mit einem C57BL/6J Hintergrund wurde 1995 von Laubach et al. publiziert um die biologische Funktion von iNOS-produziertem NO sowie dessen Rolle bei septischem Schock zu entschlüsseln. Diese Tiere sind fertil und lebensfähig und in ihrem äußeren Erscheinungsbild und in der Histologie nicht von WT Mäusen zu unterscheiden (**Laubach** 1995).

1.6.2.2 eNOS KO Mäuse

Shesely et al. generierten 1996 eNOS^{-/-} Mäuse mit einem C57BL/6J Hintergrund um den Effekt dieses Enzyms auf den Blutdruck zu erforschen. Dabei zeigte sich, dass diese Mäuse einen erhöhten Blutdruck, eine Steigerung der Reninkonzentration im Plasma trotz mittelgradiger Erniedrigung des Renin-mRNA-Gehalts in der Niere sowie eine verminderte Herzrate entwickelten (**Shesely** 1996). Trotz diesen Veränderungen sind die eNOS^{-/-} Mäuse lebensfähig und fertil. Allerdings ist der Blutdruck ca. 20mmHg höher als bei den WT Tieren, die zudem ein höheres Körpergewicht als die weiblichen eNOS^{-/-} Tiere zeigen (**The_Jackson_Lab** 2013).

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekularen Mechanismen und die pathogenetischen Faktoren der Herzkreislauferkrankung und besonders der arteriellen Hypertonie bei dem Krankheitsbild des OSAS aufzuklären. Dazu sollten anhand von eNOS^{-/-} und iNOS^{-/-} Mäusen erstmals die Rolle dieser Enzyme im Tiermodell der chronisch intermittierenden Hypoxie untersucht werden. Die Hypothese hierbei war, dass die Deletion der eNOS bzw. iNOS im Mausmodell der CIH die Pathogenese der PH und die Entwicklung eines kardialen Phänotypes beeinflusst. Weiterhin wurde vermutet, dass die Deletion von iNOS eine protektive Wirkung auf die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie hat, und dass das Fehlen von eNOS die, infolge des knockouts entstandene, arterielle Hypertonie unter CIH weiter verstärkt. Über diesen experimentellen Ansatz zur Generierung des OSAS sollte eine Grundlage zur zukünftigen Entwicklung von neuen therapeutischen Konzepten zur Behandlung der mit dem Schlafapnoe-Syndrom einhergehenden Herzkreislauferkrankung, die eine wesentliche Todesursache bei Patienten mit OSAS ist, geschaffen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden männliche eNOS knockout (KO), iNOS KO und C57BL/6J-Mäuse untersucht. Alle Tiere stammten von der Firma Charles-River Deutschland GmbH (Sulzfeld, Deutschland). Dabei wurden für die eNOS KO Mäuse die Linie B6.129P2-Nos3tm1Unc/J und für die iNOS KO Mäuse die Linie B6.129P2-Nos2tm1Lau/J verwendet.

Um eine Vergleichbarkeit mit dem Krankheitsbild der Schlafapnoe des Erwachsenen zu ermöglichen, wurden ausschließlich männliche, adulte Mäuse mit einem Gewicht von 20-30 gr und einem Alter von 8-12 Wochen eingesetzt.

Die Tiere wurden während des Versuchszeitraumes im Tierstall des Zentrums für Innere Medizin des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen gehalten und von den dort beschäftigten Tierpflegern versorgt. Sie erhielten Wasser und Futter (Altromin® Standarddiätfutter) ad libitum. Des Weiteren waren die Mäuse einer Beleuchtungsdauer von dreizehn Stunden pro Tag und einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 22°C ausgesetzt.

2.1.2 Tierversuchsgenehmigung

Die durchgeführten Versuche wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt und können unter folgendem Aktenzeichen eingesehen werden:

- GI 20/10 Nr. 84/2011
„Die Rolle der endothelialen und induzierbaren NO-Synthase im Mausmodell der Schlafapnoe“

2.1.3 Material und Geräte für das Mausmodell

2.1.3.1 Injektionslösungen und Substanzen

50% 2-Propanol / 1% Providonjod-Lösung	Braunoderm®	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Buprenorphin	Temgesic®	Essex Pharma München, Deutschland
Enrofloxacin	Baytril® 2,5%	Bayer Vital

Material und Methoden

		Leverkusen, Deutschland
Glucose 5%	Glucose 20% [®] 1:4 verdünnt	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Heparin	Heparin-Natrium-25000- ratiopharm [®]	Ratiopharm GmbH Ulm, Deutschland
Isofluran	Isofluran Baxter [®]	Baxter Deutschland GmbH Unterschleißheim, Deutschland
Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml	Ketamin 10% [®]	Belapharm GmbH & Co KG Vechta, Deutschland
Natriumchloridlösung (100 ml)	Isotonische Natriumchlorid- lösung Diaco [®]	Serag-Wiessner KG Naila, Deutschland
Natriumchloridlösung (1000 ml)	zum Spülen und Befeuchten	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Xylazinhydrochlorid	Xylazin 2% [®]	Ceva Tiergesundheit GmbH Düsseldorf, Deutschland

2.1.3.2 Verbrauchsmaterial

Antithrombotisches Gel	Re-gel Syringe	Data Science International, St. Paul, USA
Augensalbe	Bepanthen [®] Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital Leverkusen, Deutschland
Dreiwegehahn	Discofix [®]	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einbettkassetten, klein	Tissue Tek [®] 3 Uni-Cassette [®]	Sakura Finetek Europe B.V Zoeterwoude, Niederlande
Einmalhandschuhe	Vasco [®] Nitril white	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einmalnitrilhandschuhe	Peha soft [®] nitrile	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Einmalspritze 1 ml, 2 ml, 5ml, 10 ml, 20ml	Inject Luer [®]	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Einmalspritze 50 ml	Original Perfusor [®] Spritze	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Enthaarungscreme	Elca [®] Med Creme	ASID BONZ Herrenberg, Deutschland
Eppendorf Tubes	Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co Nümbrecht, Deutschland
Falconröhrchen 15ml, 50ml	Cellstar [®] Tubes	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Gewebekleber	3M Vetbond™	3M Animal Care Products St. Paul, USA
Glutaraldehyd-Lösung	auf 2% verdünnt	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Hämatokritkapillaren		Hirschmann Laborgeräte GmbH & KoKG Eberstadt, Deutschland
Hämatokritversiegelungskit		Brand GmbH & KoKG Wertheim, Deutschland

Kanülen 24 G (0,55 mm x 25mm) 26 G (0,9 mm x 25 mm) 30 G (0,3 mm x 25 mm)	BD Microlance 3®	Becton Dickinson Heidelberg, Deutschland
Medizinisches Klebeband	Durapore®	3M St. Paul, MN, USA
Nahtmaterial	Prolene® 6-0 Ethicon Polypropylen	Ethicon GmbH Norderstedt, Deutschland
Parafilm		American National Can Menasha, Wisconsin, USA
Perfusor-Leitung 150 cm		B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
PET-Schläuche	mit unterschiedlichen Durchmessern	unterschiedliche Hersteller
Polyester Garn 5/0		FSSB Jestetten, Deutschland
Schraubdeckeltubes	Cryo.s™ Einfrierröhrchen	Greiner Bio-One GmbH Frickenhäusen, Deutschland
Skalpells 10er, 11er, 20er	Feather® Disposal Scalpel	Pfimedical AG Köln, Deutschland
Ultraschallgel	Aquage®	Parker Laboratories Inc. Fairfield, USA
Venenverweilkanüle 20 G (1,1 mm x 33 mm)	Vasofix® Safety	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Zellstofftupfer 4 x 5 cm	Pur-Zellin®	Paul Hartmann AG Heidenheim, Deutschland
Zellulose-Handtücher		Tork Mannheim, Deutschland

2.1.3.3 Geräte für die Blutdruckmessung

Datenkonvertierer	Data Exchange Matrix™	Data Science International St. Paul, USA
Receiver	PhysioTel® Receiver RPC-1	Data Science International St. Paul, USA
Software	Dataquest A.R.T. Version 3.0	Data Science International St. Paul, USA
Umgebungsdruckbarometer	Ambient Pressure Reference Model APR-1	Data Science International St. Paul, USA

2.1.3.4 Geräte für Echokardiographie

EKG Tisch	Vevo 770	VisualSonics Inc. Toronto, Ontario, Kanada
Isofluranverdampfer	Vet Equip	KF Technology Rom, Italien
Rektalthermometer		Indus Instruments Houston, Texas
Ultraschallgerät	Vevo 770	VisualSonics Inc. Toronto, Ontario, Kanada

2.1.3.5 Geräte und Materialien für das Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie

Membranvakuumpumpe	ME 16	Vaccubrand Wertheim, Deutschland
Pumpensteuerung		Selbstentwickelte Microsoft Access Anwendung zum internen Gebrauch
Sauerstoffmessgerät	X-am 2000	Dräger
Stickstoffgenerator	NGM44-LC/MS	cmc Instruments GmbH Eschborn, Deutschland
Vakuumregler	CVC 3000, VNC 1	Vaccubrand Wertheim, Deutschland

2.1.3.6 Geräte für die Oxymetriemessung

Kontrollbox	MouseOx [®] Oximeter Control Box	Starr Life Sciences Corp Oakmont, USA
Messaufnehmer	ManualSpin [™] Low-Torque Commutator	Starr Life Sciences Corp Oakmont, USA
Messclip	CollarClip [™] small	Starr Life Sciences Corp Oakmont, USA

2.1.3.7 Geräte für chirurgische Eingriffe (Transmitterimplantation, hämodynamische Messung)

Beatmungspumpe	MiniVent Type 845	Hugo Sachs Elektronik March, Deutschland
Clip für A. femoralis	S&B-1 vascular clamp	FST Fine science tools GmbH Heidelberg, Deutschland
Computer mit Monitor		
Druckaufnehmer	APT 300	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Druckwandler	Combitrans Monitoring Set Mod. II for arterial Blood Pressure Measurement	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Hämatokrit-Zentrifuge	Hämatokrit 210	Hettrich Zentrifugen Tuttlingen, Deutschland
Katheter für V. jugularis	Hyman Mouse Pressure Catheter 14 cm	Nu MED Inc. Hopkinton, USA
Operationsbesteck		FST Fine science tools GmbH Heidelberg, Deutschland
Software von HSE	Pulmodyn W	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Spülkanüle	Pulmonalarterieller Katheter Sonderanfertigung für ILU1	Hugo Sachs Elektronik Hugstetten, Deutschland
Stativ	Zum Halten der Spritzen während des Spülens	

Trachealtubus	aus Vasofix® Safety 20G gekürzt auf ca. 1,5 cm	B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Transmitter	TA11PA-C10	DSI Data Science International, St. Paul, USA
Vergrößerungslupe	MS5	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Wasserbad		Keutz Labortechnik Reiskirchen, Deutschland
Wärmematte	Thermolux®	Witte + Sutor GmbH Murrhardt, Deutschland

2.1.4 Histologie

2.1.4.1 Geräte/ Software/ Makros

Computer	Q 550 IW	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Digitale Kamera	DC 300F	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
geschlossener Vakuum- Gewebeinfiltrationsautomat	TP 1050	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Kühlplatte	EG 1150C	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Makro für - Kollagengehalt - Muskularisierungsgrad		entwickelt von Hr. Christoph Frank (Informatiker), Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Objektträgerstrecktisch	HI 1220	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinausgießstation	EG 1140H	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffinstreckbad	HI 1210	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Rotationsmikrotom Vollautomatisch	RM 2165	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Software	Q Win V3	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Stereomikroskop Durchlicht	DMLA	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Wärmeschrank		Memmert GmbH & Co KG Schwabach, Deutschland

2.1.4.2 Verbrauchsmaterial

Deckgläser 24 x 36mm		R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Eindeckmedium Xylol-löslich	Pertex®	Medite GmbH Burgdorf, Deutschland

Mikrotomklingen S 35	Feather	Produkte für die Medizin AG Köln, Deutschland
Objektträger	Superfrost Plus®	R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Paraffin Einbettmedium	Paraplast Plus®	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Selecta Faltenfilter		Schleicher + Schüll GmbH Dassel, Deutschland

2.1.4.3 Lösungen, Kits und Antikörper für Färbungen

Albumin bovine Fraction V		Serva Electrophoresis GmbH Heidelberg, Deutschland
Anti-alpha-smooth muscle Actin; Clone 1A4 monoklonal, mouse anti-human	Verdünnung 1:800 mit 10% BSA	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Anti-von Willebrand Faktor polyklonal, rabbit anti-human	Verdünnung 1:1200 mit 10% BSA	Dako Cytomation Hamburg, Deutschland
Avidin-Biotin-Blocking Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl
DAB Peroxidase Substrat Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl.
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, pro analysi	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck Darmstadt, Deutschland
Eisen-Haematoxylin A nach Weigert enthält Ethanol		Division Chroma Münster, Deutschland
Eisen-Haematoxylin B nach Weigert		Division Chroma Münster, Deutschland
Essigsäure 100%		Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70%, 96%, 99,6% Vergällt mit Ethylmethylketon		Fischer Saarbrücken, Deutschland
Formaldehyd – Lösung 3,5 – 3,7 %	neutral gepuffert mit Methanol stabilisiert	Otto Fische GmbH & Co. KG Saarbrücken, Deutschland
Formaldehyd säurefrei $\geq 37\%$		Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
ImmPRESS™ Reagent Anti-Rabbit Ig		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl.
Isopropanol (99, 8%)		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	KCl	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat pro analysi	KH_2PO_4	Merck Darmstadt, Deutschland
Methanol, reinst		Fluka Chemie Buchs, Schweiz
Methylgrün		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl.
Natriumchlorid pro analysi	NaCl	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland

Pikrinsäure, wässrig, gesättigt		Appli Chem GmbH Darmstadt, Deutschland
Proteinase K	Dako Real™	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH Eching, Deutschland
R.T.U. Normal horse Serum	2,5%	Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl
Resorcin Fuchsin		Waldeck GmbH & CO. KG Münster, Deutschland
Salzsäure 25%	HCl	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Säurefuchsin		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Sirius Rot F3B Lösung		Niepötter Labortechnik Bürstadt, Deutschland
Trypsin	Digest All 2®	Zytomed Berlin, Deutschland
Vector VIP® Substrat Kit		Vector / Linaris Wertheim-Bettingen, Dtl.
Wasserstoffperoxid 30% pro analysi		Merck Darmstadt, Deutschland
Xylol		Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland

2.1.5 Molekularbiologie

2.1.5.1 Verbrauchsmaterial

2 ml Schraubverschluss- Gefäße	Mikro-Schraubröhre	Sarstedt Nümbrecht, Deutschland
4x NuPage LDS		Invitrogen Karlsruhe, Deutschland
6x Loading Dye		Fermentas St. Leon Rot, Deutschland
96-well Mikroplatten		Thermo Fischer Scientific Schwerte, Deutschland
Acrylamid/Bis		Serra Nürnberg, Deutschland
Agarose		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Amersham Hyperfilm ECL GE		GE Healthcare München, Deutschland
APS	Ammoniumperoxodisulfat	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
<i>Aqua dest.</i>		B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
CaCl ₂	Kalziumchlorid	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Chemilumineszenzfilm	Cronex 5 Medical X-Ray Film	Agfa, Morstel, Belgien

Material und Methoden

Complete®		Roche Mannheim, Deutschland
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Glycin		Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
HCl 37%	Salzsäure 37%, rauchend	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Keramikkügelchen	1,4mm	Peqlab Erlangen, Deutschland
NaN ₃	Natriumacid	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Na-Orthovanadat (200mM)		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Nitrocellulose-Membran		Pall Corporation Dreieich, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße		Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
PMSF (100mM)	Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Proteinase K	Dako Real™	BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH Eching, Deutschland
PVDF-Membran	Polyvenylidendifluorid	Pall Corporation Dreieich, Deutschland
Real-time PCR-Reaktionsgefäße		Thermo-Fischer (Abgene), Hamburg, Deutschland
SDS (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide)	Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Skim Milk		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
SYBR safe DNA gel stain		Invitrogen Karlsruhe, Deutschland
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
TRIS-Pulver 0,5M pH 6,8	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
TRIS-Pulver 1,5M pH 8,8	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Tween 20		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland
Whatman-Filter		Schleicher & Schuell Dassel, Deutschland
β-Mercaptoethanol		Sigma Aldrich Steinheim, Deutschland

2.1.5.2 Kits und Standards

DC Protein Assay		Bio-Rad München, Deutschland
DNA-Standard	GeneRuler™ 100bp Ladder	Fermentas St. Leon-Rot, Deutschland
iScript cDNA-Synthese Kit		Bio-Rad München, Deutschland
iTaq™ SYBR® Green Supermix with Rox		Bio Rad München, Deutschland
peqGOLD MicroSpin total RNA Kit	Protokol C Protokol D für Aorta	Peqlab Erlangen, Deutschland
peqGOLD total RNA Kit		Peqlab Erlangen, Deutschland
Proteinstandard	Precision Plus Protein™ Standards (Dual Color)	Bio-Rad München, Deutschland
RNAse-free DNase Set		Quiagen Hilden, Deutschland

2.1.5.3 Geräte

Bio Imaging System	ChemiGenius	VWR (Syngene) Darmstadt, Deutschland
Elektrophoresekammer		Keutz Labortechnik Reiskirchen, Deutschland
Entwicklermaschine	Curix	Agfa Morstel, Belgien
Homogenisator	Precellys 24	Peqlab Erlangen, Deutschland
Mikroplattenlesegerät (1)	Elx808	Bio Tek Bad Friedrichhall, Deutschland
Mikroplattenlesegerät (2)	Molecular Devices Versamax Microplatereader	MDS Analytical Technologies Ismaning, Deutschland
Mikrozentrifuge 200R		Hettich Tuttligen, Deutschland
Real Time PCR System	Mx3000P® QPCR System	Agilent (Stratagene), Waldbronn, Deutschland
Semidry-Blot-System		Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Spannungsgerät für Elektrophorese		Biometra Göttingen, Deutschland
Spektrometer, NanoDrop	ND-1000	Kisker-Biotech Steinfurt, Deutschland
Thermoblock		VWR Bruchsal, Deutschland
Thermocycler	T-personal	Biometra Göttingen, Deutschland
Vertikal-/Horizontalschüttler		Keutz Labortechnik, Reiskirchen

2.1.5.4 Primerdesign und verwendete Primer

Zur Primererstellung wurde das frei verfügbare Programm „Primer 3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) verwendet. Hiermit wurden die Primer so konstruiert, dass ihre Schmelztemperatur zwischen 61 und 63°C lagen, so dass sie mit demselben PCR-Programm verwendet werden konnten. Anschließend wurden die Primer als 100 µM Lösung von der Firma Metabion International AG (Martinsried, Deutschland) bezogen. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.1.1 aufgeführt.

Gen	Primersequenz	Produktgröße (bp)
β-Aktin	F: 5'-GGCTACAGCTTCACCACCAC-3'	425
	R: 5'-GAGTACTTGCGCTCAGGGG-3'	
B2M	F: 5'-AGCCCAAGACCGTCTACTGG-3'	128
	R: 5'-TTCTTTCTGCGTGCATAAATTG-3'	
eNOS	F: 5'-GCTCCCAACTGGACCATCTC-3'	181
	R: 5'-GACGCTGGTTGCCATAGTGA-3'	
HPRT1	F: 5'-GCTGACCTGCTGGATTACAT-3'	202
	R: 5'-TTGGGGCTGTACTGCTTAAC-3'	
iNOS	F: 5'-TGATGTGCTGCCTCTGGTCT-3'	229
	R: 5'-AATCTCGGTGCCCATGTACC-3'	

Tabelle 2.1.1 Verwendete Primer für die real-time PCR

2.1.5.5 Antikörper für Westernblot

Die Antikörper (AK) wurden für die Westernblotanalysen in 6% (w/v) Milch gelöst und in Tris gepufferter Kochsalzlösung mit Tween (tris buffered saline with tween, TBST), verdünnt. Folgende AK wurden verwendet (Tabelle 2.1.2):

Primärantikörper				
Name	Spezies	Firma	Bestellnr.	Verdünnung
β-Aktin	Mouse	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland	A5316	1:50000
eNOS	Rabbit	BD Biosciences Heidelberg, Deutschland	610298	1:500
iNOS	Rabbit	Abcam Cambridge, UK	ab3523	1:500
α-Tubulin	Mouse	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland	sc-5286	1:20000

Sekundärantikörper (Peroxidase gekoppelt)				
Name	Spezies	Firma	Bestellnr.	Verdünnung
Anti-Mouse	Rabbit	Promega Mannheim, Deutschland	W402B	1:5000
Anti-Rabbit	Goat	Promega Mannheim, Deutschland	W401B	1:5000

Tabelle 2.1.2: Verwendete Antikörper und ihre Verdünnung

2.2 Methoden

2.2.1 Mausmodell: chronisch intermittierende Hypoxie

Um die Schlafapnoe des Menschen mit einhergehender Hypertonie zu imitieren, wurden die Mäuse für acht Stunden täglich über einen Zeitraum von 6 Wochen (5 Tage pro Woche) der chronisch intermittierenden Hypoxie (CIH) ausgesetzt. Hierbei wurden die Tiere in einer geschlossenen, normobaren Kammer (1) gehalten, welcher in zyklischer Abfolge Stickstoff und Raumluft zugeführt wurde. Durch die Stickstoffzufuhr wurde die Sauerstoffkonzentration in der Kammer von 21% (normale Raumluft) auf 6-7% reduziert. Dieser Verringerung der Sauerstoffkonzentration für die Dauer einer Minute schloss sich eine einminütige normoxische (21%) Phase an. Hierbei wurde mittels einer Pumpe (2) (Modell ME16, vaccubrand) Raumluft der Kammer zugeführt. Das Einströmen der Gase wurde über Regler (3) (Model VNC 1 und CVC 3000, vaccubrand), welche durch ein PC-Programm (4) (Pumpensteuerung) gesteuert wurden, geregelt. Die Sauerstoffkonzentration in der Kammer wurde anhand des Sauerstoffmessgerätes (5) (Dräger X-am 2000) kontinuierlich überprüft.

Zur Kontrolle wurden Tiere in einem baugleichen System, dem in einminütiger Abfolge Raumluft (21%) zugeführt wurde, unter den gleichen Versuchsbedingungen gehalten.

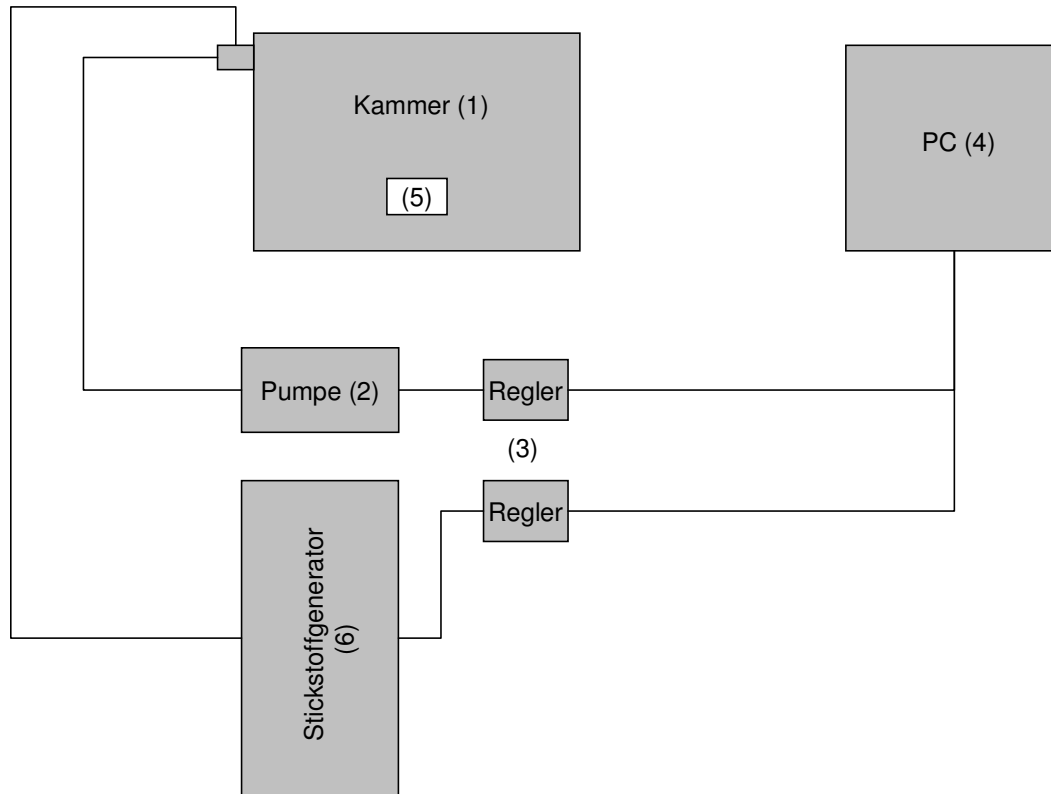


Abbildung 2.2.1: Schematischer Aufbau des Systems.

2.2.1.1 Aufteilung der Tiergruppen

Folgende Tiergruppen wurden gebildet:

C57BL/6J (insgesamt 30 Tiere)

- n = 10 CIH mit Blutdruckkatheter
- n = 5 CIH ohne Blutdruckkatheter
- n = 10 Normoxie mit Blutdruckkatheter
- n = 5 Normoxie ohne Blutdruckkatheter

eNOS KO (insgesamt 26 Tiere)

- n = 9 CIH mit Blutdruckkatheter
- n = 4 CIH ohne Blutdruckkatheter
- n = 10 Normoxie mit Blutdruckkatheter
- n = 3 Normoxie ohne Blutdruckkatheter

iNOS KO (insgesamt 26 Tiere)

- n = 9 CIH mit Blutdruckkatheter
- n = 4 CIH ohne Blutdruckkatheter
- n = 10 Normoxie mit Blutdruckkatheter
- n = 3 Normoxie ohne Blutdruckkatheter

2.2.1.2 Überprüfung der arteriellen Sauerstoffsättigung

Vor Beginn des Versuchs wurden einmalig jeweils 5 C57BL/6J-, e- und iNOS KO-Mäuse mittels eines Gemischs aus 40 µg/g Körpergewicht Ketaminhydrochlorid (Ketavet®) und 0,6 µg/g Körpergewicht Xylazin (Rompun® 2%ig) durch intraperitoneale Injektion narkotisiert und für 10-15 Minuten der chronisch intermittierenden Hypoxie (CIH) ausgesetzt. Dabei wurde mittels eines Oxymeters (Starr Life Science Corp., Mouse Collar Clip), der über einen Messaufnehmer (2) mit einem Computer (3) verbunden war, die Sauerstoffsättigung der Tiere festgehalten. Dieses Oxymeter wurde mittels eines nicht invasiven Clips (1) an dem rasierten Nacken der Mäuse befestigt. Eine Betäubung war notwendig, um die Tiere zu immobilisieren und eine Verfälschung der Ergebnisse aufgrund von Bewegungsartefakten o.ä. während der Messung der Sauerstoffsättigung auszuschließen. Das Aufwachen der Tiere aus der Narkose erfolgte unter Beobachtung.

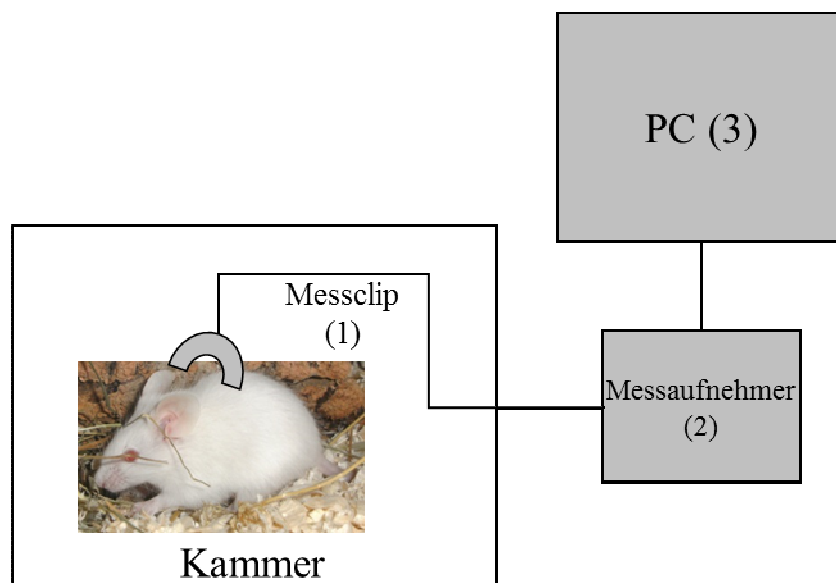


Abbildung 2.2.2: Schematischer Aufbau der Oxymetriemessung.

2.2.1.3 Implantation des Transmitters mit arteriellem Katheter

Zur Narkotisierung erhielten die Mäuse ein Gemisch aus 40 µg/g Körpergewicht Ketaminhydrochlorid (Ketavet®) und 0,6 µg/g Körpergewicht Xylazin (Rompun® 2%ig) durch intraperitoneale Injektion. Nach Erreichen einer sicheren Narkosetiefe (Verlust des Zwischenzehenreflexes) wurde den Tieren Bepanthen® Augensalbe auf die Cornea aufgetragen, um diese vor dem Austrocknen zu schützen. Nun wurden die Tiere in Rückenlage auf eine mit Zellstofftüchern bedeckte Wärmeplatte (Thermolux®) verbracht und die linke Hintergliedmaße mit Durapore® Klebeband fixiert. Nach gründlicher Rasur und Hautdesinfektion mit Braunoderm® wurde im linken Inguinalbereich mittels einer kleinen Schere eine ca. 1cm lange Hautinzision gesetzt und das nun freiliegende Fettgewebe stumpf freipräpariert. Danach wurde das Unterhautfettgewebe von der Inzisionsstelle ausgehend auf 1-2 cm Höhe stumpf von der Haut gelöst, um das Platzieren des Transmitters (Ta11PA-C10, DSI) im Rückenbereich zu ermöglichen. Anschließend wurde unter der nun freiliegenden A. und V. femoralis unter Schonung des Nervs ein Polyesterfaden durchgezogen, welcher ligiert, gespannt und mit einem Durapore® Klebestreifen auf den Zellstofftüchern fixiert wurde. Dies ermöglicht eine leichte Streckung des Gefäßes und somit eine leichtere Implantation des Katheters. Danach wurde die A. femoralis mittels einer Klemme gestaut und stumpf von der V. femoralis gelöst. Ein zweiter Polyesterfaden wurde um die A. femoralis gezogen, um nach der Katheterimplantation den Katheter in dem Gefäß zu fixieren. Mittels einer Federschere wurde unterhalb der abgeklemmten Stelle eine Inzision der A. femoralis gesetzt. Diese wurde unter Zuhilfenahme einer gebogenen und abgeschliffenen 30G Kanüle geweitet und der Katheter, welcher mit dem telemetrischen Transmitter verbunden war, in die A. femoralis eingeführt. Anschließend wurde die Klemme gelöst und der Katheter ca. 1,5 cm tief bis in die Aorta abdominalis vorgeschoben. Der Polyesterfaden wurde nun um den im Gefäß liegenden Katheter ligiert und die Enden abgeschnitten. Zur weiteren Fixation wurde auf den Katheter-Arterien-Übergang ein Tropfen Gewebekleber (3M Vetbond™) gegeben. Um nach dem Aufwachen eine analgetische Versorgung zu gewährleisten, wurde den Tieren subkutan Buprenorphin (Temgesic® 0,1mg/kg) verabreicht und schließlich die Hautwunde mit Einzelheften (6.0 Prolene®) verschlossen. Abschließend wurden die Mäuse zum Aufwachen in ihre Käfige verbracht.

Die Tiere wurden für weitere 3 - 5 Tage (abhängig vom klinischen Befund) *post operationem* mit Buprenorphin (Temgesic®) in einer Dosierung von 0,1 mg/kg s.c. 2x täglich, analgetisch behandelt. Außerdem erhielten sie für 5 Tage Baytril® 2,5% oral als Antibiotikum (5 - 10 mg/kg oral) über das Trinkwasser.

Nach Wundheilung (nach 1 Woche) wurden die Tiere der wiederholten Hypoxie, wie unter 2.2.1 beschrieben, ausgesetzt.

2.2.1.4 Messung des arteriellen Blutdruckes

Die Messung des systolischen und diastolischen Blutdrucks wurde in dem Zeitraum durchgeführt, den die Mäuse nicht unter den Bedingungen der CIH verbrachten (10-12 Stunden am Tag). Hierbei sendete der implantierte Transmitter, dessen Katheterspitze sich in der Aorta abdominalis befindet das Blutdrucksignal über einen Receiver (2) (Modell RPC-1 DSI, USA) zu einem Datenkonvertierer (3) (Data Exchange Matrix™ DSI, USA), der mit einem Computer (5) verbunden war. Um Verfälschungen durch den Umgebungsdruck zu verhindern, wurde ein Barometer (4) (ambient pressure reference Model APR-1 DSI, USA) zwischengeschaltet. Die Mäuse waren hierbei in normalen Typ II (1) Käfigen untergebracht und einem normalen Tag/Nacht-Rhythmus ausgesetzt. Der Blutdruck wurde in einminütigen Abständen gemessen und aufgezeichnet. Zur Auswertung des Blutdruckes wurde an jedem Messtag der Mittelwert aller aufgezeichneten Drücke einer Maus berechnet und anschließend die Blutdrucks-Mittelwerte aller Mäuse gebildet.

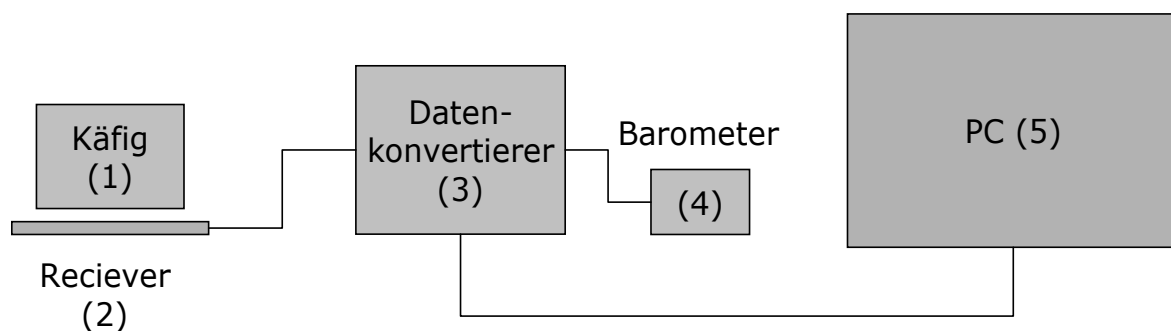


Abbildung 2.2.3: Schematischer Aufbau der Blutdruckmessung.

2.1.1.5 Echokardiographie

Bei allen katheterimplantierten Tieren erfolgte 1 Tag vor der Implantation (Tag 0) und ein Tag vor Ende des Versuchs (Tag 50) eine echokardiografische Untersuchung

unter Isoflurannarkose. Diese Untersuchung wurde aufgrund seiner Expertise in diesem Bereich von Herrn Dr. Baktybek Kojonazarov durchgeführt.

Am Versuchsende (Tag 51) wurden bei allen Mäusen mit Hilfe von Frau Tierärztin Daniela Haag der rechtsventrikuläre systolische Druck (RVSP) gemessen. Weiterhin wurden die Aorta, die A. carotis, die A. pulmonalis, die A. renalis, die A. femoralis, das Herz, die Lunge und Blut entnommen und bis zur Verwendung für molekularbiologische Untersuchungen bei -80°C aufbewahrt bzw. für histologische Untersuchungen in Formaldehyd fixiert.



Abbildung 2.2.4: Versuchsverlauf für alle Gruppen

2.2.2 Echokardiographie

Die echokardiographischen Untersuchungen wurden freundlicherweise mit Hilfe von Herrn Dr. Baktybek Kojonazarov durchgeführt und werden zur Vervollständigung der hier vorliegenden Arbeit mit aufgeführt.

Die transthorakale Doppler-/Echokardiographie ist das führende, nicht-invasive bildgebende Verfahren zur Untersuchung des kardiovaskulären Systems bei Ratten und Mäusen. Um Ultraschalluntersuchungen an Mäusen durchführen zu können, müssen diese mittels Inhalationsnarkose anästhesiert werden. Dazu wurden die Tiere in eine Narkosekammer gesetzt, welche mit einem 3%igen Isofluran/Sauerstoff-Gemisch geflutet wurde. Zur anschließenden echokardiografischen Untersuchung wurden die narkotisierten Mäuse in Rückenlage auf eine Wärmeplatte mit integriertem Elektrokardiogramm (EKG)-Elektrodenplättchen verbracht und vorsichtig mit einem Klebestreifen an jeder Gliedmaße auf den EKG-Kontakten fixiert. Die EKG-Elektroden ermöglichten zeitgleich zur Ultraschalluntersuchung die Aufzeichnung eines Ein-Kanal-EKGs.

Während der Untersuchung wurde die Narkose durch einen Nasenkonus in einer Konzentration von 1,5% Isofluran/Sauerstoff aufrechterhalten. Ein rektal eingeführter Temperaturmessfühler regelte automatisch die Temperatur der Wärmeplatte in Abhängigkeit von der Körpertemperatur der Maus. Um Bildartefakte zu vermeiden wurde der Thorax sowie das kraniale Abdomen rasiert und anschließend die verbliebenen Haare mit einer Enthaarungscreme vollständig entfernt. Nun wurde angewärmtes Ultraschallgel luftblasenfrei auf den Thorax aufgetragen. Das aufgetragene Gel dient als Schallfenster und ermöglicht eine bessere Fokussierung. Die folgende echokardiographische Untersuchung wurde mit einem 30 MHz Doppler- und einem 30 MHz 2D- Linearschallkopf durchgeführt.

Nach der Untersuchung wurden die Klebestreifen entfernt, die Mäuse sorgfältig vom Ultraschallgel gesäubert und anschließend in einen Käfig verbracht, in welchem sie fünf bis zehn Minuten lang, bis zum vollständigen Erlangen des Bewusstseins und der motorischen Fähigkeiten, beobachtet wurden.

Nach einer einstündigen Erholungsphase wurden die Tiere wieder den Bedingungen der CIH- bzw. Normoxiekammer ausgesetzt.

Erhobene Parameter:

Cardiac output (CO)

Als cardiac output (CO) oder Herzminutenvolumen wird das Volumen des Blutes, welches in einer Minute vom Herzen über die Aorta ascendens in den Blutkreislauf gepumpt wird, bezeichnet. Berechnet wird der CO aus Schlagvolumen x Herzfrequenz (HF). Zur Bestimmung des Schlagvolumens wurde in der echokardiographischen Untersuchung der linksventrikuläre Ausflusstrakt bestimmt (LVOT). Mit dessen Durchmesser und dem Integral der Strömungsgeschwindigkeit innerhalb der Aorta während der Systole (Velocity Time Integral (VTI)) kann das Schlagvolumen anhand folgender Formel berechnet werden. Die Einheit des CO ist Milliliter pro Minute.

$$\text{CO} = (\text{LVOT} \times \text{VTI}) \times \text{HF}$$

Cardiac index (CI)

Der CI ist der CO bezogen auf die Körperoberfläche. Die Einheit ist Milliliter pro Minute pro Körpergewicht in Gramm.

$$CI = CO / KGW$$

Ejection fraction (EF)

Die ejection fraction oder Auswurfraction ist ein Maß, um die systolische Funktion des linken Ventrikels zu bewerten und bezeichnet den Anteil an ausgeworfenem Blut während einer Kontraktion in %. Dies entspricht dem Schlagvolumen (SV) im Verhältnis zum Gesamtblutvolumen bzw. enddiastolischen Volumen (EDV). Berechnen lässt sich das Schlagvolumen indem man das endsystolische Volumen (ESV) vom enddiastolischen Volumen subtrahiert:

$$EF = [(EDV - ESV) / EDV] * 100$$

Isovolumic relaxation time (IVRT)/RR

Als IVRT des linken Ventrikels bezeichnet man den Zeitraum zwischen dem Schluss der Aortenklappe und dem Öffnen der Mitralklappe. Dem entgegen steht die IVRT des rechten Ventrikels, die den Zeitraum zwischen dem Schluss der Pulmonalklappe und dem Öffnen der Trikuspidalklappe definiert. Die IVRT wird auf die Herzfrequenz normalisiert und ermöglicht so, Angaben über die diastolische Funktion des linken Ventrikels zu machen. Sie wird in Prozent angegeben. Das RR kennzeichnet dabei die Zeit zwischen zwei R-Zacken im EKG, wodurch die Zeit zwischen zwei Herzschlägen (Dauer eines Herzschlages) angegeben wird.

LV E' (early) and A' (late) peak diastolic velocities ratio

Mit diesem Parameter lässt sich die diastolische Funktion des linken Ventrikels bestimmen. Hierbei werden unter Zuhilfenahme des Pulsed-Wave-Dopplers Geschwindigkeitsprofile im Bereich der Mitralklappe gemessen. Berechnet wird der Parameter anhand der Geschwindigkeitsdifferenz zwischen der E'-Welle, welche die frühdiastolische, passive Füllung des LV beschreibt und der A'-Welle, welche die spätdiastolische aktive (durch die Vorhofkontraktion bedingt) LV-Füllung bezeichnet.

LV peak systolic velocity/ RV peak systolic velocity

Peak systolic velocity ist ein Parameter welcher die systolische Funktion des Herzens beschreibt und welcher mittels Tissue-Doppler gemessen werden kann.

Myocardial performance index (MPI)

Der MPI ist ein Parameter zur Charakterisierung der systolischen und diastolischen Funktion sowohl des linken als auch des rechten Ventrikels. Er errechnet sich aus der Summe der isovolumetrischen Kontraktionszeit (IVCT) und der isovolumetrischen Relaxationszeit (IVRT), dividiert durch die Ejektionszeit (ET). Zur Bestimmung dieser Werte ist eine Messung mittels Tissue-Doppler notwendig. Der MPI dient als Prognosekriterium bei Patienten, die unter einer PH leiden (**Howard** 2011; **Vonk Noordegraaf** 2011).

Tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE)

TAPSE ist ein Parameter für die systolische Funktion des rechten Ventrikels und beschreibt die Distanz, die der Trikuspidalring zwischen Enddiastole und Endsystole zurücklegt. Gemessen wird sie in mm und korreliert mit der rechtsventrikulären Ejektionsfraktion (s.o.) Dieser Parameter dient ebenfalls als wichtiger prognostischer Faktor für die Überlebensdauer von Patienten mit einer PH (**Howard** 2011; **Vonk Noordegraaf** 2011).

2.2.3 Hämodynamische Messungen

2.2.3.1 Implantation des Katheters

Den 6 Wochen Exposition in CIH bzw. Normoxie schloss sich die Messung des RVSP der Tiere an. Um eine Koagulation des Blutes während der Messung zu verhindern, wurde den Mäusen 15 Minuten vor deren Beginn 1 I.E. Heparin pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal sublimiert. Zur Vorbereitung des Messsystems wurden die Druckaufnehmer, die Schläuche und der angeschlossene Katheter mit physiologischer Kochsalzlösung luftblasenfrei gespült sowie das Programm Pulmodyn W[®] (von HSE) gestartet. Dieses Programm wurde zur Aufzeichnung des RVSP verwendet.

Anschließend wurden die Tiere durch intraperitoneale Gabe eines Gemisches aus 40 µg pro g Körpergewicht Ketaminhydrochlorid (Ketavet[®]) und 0,6 µg pro g

Körpergewicht Xylazin (Rompun® 2%) in Narkose gelegt. Nach Erreichen einer sicheren Narkosetiefe (Verlust des Zwischenzehenreflexes) wurden die Mäuse in Rückenlage auf einer Gummiunterlage fixiert und in ein, mittels 40°C warmen Wassers beheiztes, Kunststoffbecken verbracht. Zur Erleichterung der Atmung wurde die Zunge vorgelagert.

Damit keine Haare das Operationsfeld verunreinigten wurde das Fell im Halsbereich mit Braunoderm®-Lösung befeuchtet. Danach wurde ein ca. 1 x 1 cm großes Hautstück per Scherenschlag entfernt sowie die darunter zum Vorschein kommenden Glandulae mandibulares vorsichtig seitlich vom Operationsfeld gelagert. Die jetzt sichtbaren Muskeln, die entlang und über der Trachea verlaufen wurden stumpf zur Seite präpariert, damit ein Faden (5/0) unterhalb der Trachea durchgeführt und eine Ligatur lose vorgelegt werden konnte. Zur Intubation der Mäuse erfolgte eine Inzision der Trachea unterhalb des Larynx und das Einführen des Tubus (Vasofix®Safety 20 G, gekürzt auf ca. 1,5 cm) in die Trachea. Die vorgelegte Ligatur wurde nun zur Fixation des Tubus gezogen und die Tiere mit einer Frequenz von 140 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 10 µl pro Gramm Körpergewicht beatmet. Es wurde ein positiv-endexpiratorischer Druck von 1 cm Wassersäule festgelegt, um das Kollabieren der Alveolen während der maschinellen Expiration zu vermeiden.

Nun wurde die rechte V. jugularis stumpf freipräpariert und mit zwei Fäden untergelegt. Der craniale Faden wurde zur Streckung des Gefäßes ligiert, gespannt und mit einem Durapore® Klebestreifen am Wasserbad fixiert. Nach Kalibrierung des RSVP wurde die V. jugularis zwischen den beiden Bindfäden inzidiert, der Katheter ca. 5 mm tief in die Vene eingeführt und mit dem caudalen Bindfaden fixiert. Nachdem der Katheter bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben wurde, konnte der RVSP aufgezeichnet werden. Hierbei entspricht der systolische rechtsventrikuläre Druck bei intakter Pulmonalklappe dem systolischen pulmonalarteriellen Druck (**Rosenkranz 2011**).

Die gemessenen Drücke wurden durch die flüssigkeitsgefüllten Druckaufnehmer als analoge Signale aufgenommen, verstärkt und durch eine Wandlerkarte im PC in digitale Signale umgewandelt. Das Programm Labtech Pro® zeichnete die Drücke für die Dauer der Messung (10- 15 Minuten) auf.

2.2.4 Blutentnahme

Nach Beendigung der hämodynamischen Messung wurden Thorax und Abdomen mit Braunoderm® befeuchtet sowie die Haut in diesem Bereich mit Hilfe einer Schere bis hin zum Manubrium sternum entfernt. Anschließend wurden direkt unterhalb des Rippenbogens die Haut und Muskelschichten beidseits der Medianen durchtrennt und so das Abdomen eröffnet. Danach wurde das Diaphragma inzisiert, mittels einer 1 ml Spritze mit aufgesetzter 24G-Kanüle das Herz punktiert und daraus Blut entnommen.

Das Blut wurde in ein heparinisiertes Eppendorf Tube verbracht und bei 9500 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Nun wurde das Plasma in ein Schraubdeckeltube pipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren (-196°C) und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.5 Hämatokrit

Der Hämatokrit wurde bei allen Mäusen gemessen und diente als Kontrolle der hypoxischen Bedingungen. Hierzu wurde am Ende der hämodynamischen Messung der rechtsventrikuläre Katheter entfernt und das aus der V. jugularis austretende Blut mit einer Kapillare aufgefangen. Diese wurde einseitig unter Zuhilfenahme des Hämatokritversiegelungskites verschlossen und in einer Zentrifuge bei 16060 x g für 4 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Hämatokrit mit der Skala des Zentrifugendeckels abgelesen.

2.2.6 Entnahme der Lunge

Hierzu wurde das inzisierte Diaphragma ventral von den Rippen gelöst und die Thoraxhöhle dargestellt. Folgend wurde das Sternum auf gesamter Länge medial durchtrennt und beide Teile seitlich mit gebogenen 24 G Kanülen fixiert.

Nun wurden beide Ventrikel mit einer Federschere inzisiert. Der Schnitt des linken Ventrikels dient dabei als Abfluss der Spüllösung, in den des rechten Ventrikels wurde eine Spülkanüle bis in die A. pulmonalis eingeführt. Über die Spülkanüle wurde die Lunge nun mit isotoner Kochsalzlösung bei einem Druck von 22 cm Wassersäule bis zur Blutfreiheit gespült. Um ein Kollabieren der Alveolen zu verhindern wurde während des Spülens die Trachea extubiert und stattdessen eine Spülkanüle (Vasofix® Safety 20 G ohne Mandrin) eingeführt. Mit dieser wurde isotone Kochsalzlösung mit einem Gegendruck von 10 cm Wassersäule eingeleitet.

Sobald die Lungenlappen blutfrei waren, wurden die Spülkanülen entfernt und die Lunge entnommen. Die rechten Lungenlappen wurden für molekularbiologische Verfahren einzeln in Schraubdeckeltubes verbracht, schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Der linke Lungenlappen wurde für histologische Untersuchungen in Einbettkassetten gelegt und 24h bei Raumtemperatur in Formaldehyd gelagert. Anschließend wurde der fixierte linke Lungenlappen für 24h in 0,1 M phosphatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) bei 4°C und für weitere 24h in 50% Ethanol gelagert. Schließlich wurde der Lungenlappen bis zur weiteren Verwendung in 70% Ethanol überführt und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.7 Entnahme der Blutgefäße

Alle Blutgefäße wurden für molekularbiologische Untersuchungen verwendet. Hierzu wurden sie in Schraubdeckeltubes schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.7.1 A. carotis

Nach Blut- und Lungenentnahme wurde die linke A. carotis im Bereich der Apertura thoracis cranialis sowie etwas oberhalb dieser durchschnitten und der ca. 0,5 cm lange Anteil entfernt.

2.2.7.2 Aorta

Die Aorta wurde von der Herzbasis ausgehend mit einer Pinzette stumpf vom umliegenden Binde- und Fettgewebe gelöst. Folgend wurde die Aorta ascendens, der Arcus aortae und die Aorta descendens bis hin zum Diaphragma entnommen.

2.2.7.3 A. pulmonalis

Im Anschluss an die Aortenentnahme wurde die A. pulmonalis von Binde- und Fettgewebe gelöst und mittels einer Federschere von der Herzbasis getrennt und herausgenommen.

2.2.7.4 A. renalis

Um die A. renalis entnehmen zu können wurde die Muskelschicht ausgehend von der Apertura thoracis caudalis bis hin zur Regio pubica per Scherenschlag durchtrennt. Nun wurde die rechte Niere dargestellt und die damit verbundene A. renalis stumpf vom Bindegewebe abgelöst und ca. 0,5 cm entfernt.

2.2.7.5 A. femoralis

Zur Darstellung der A. femoralis wurde im rechten Inguinalbereich eine Inzision gesetzt, die Arterie von den umliegenden Strukturen (Vene, Nerv, Bindegewebe) befreit und ein ca. 0,5 cm langes Stück entnommen.

2.2.8 Entnahme des Herzens

Nach Entfernung von Aorta und A. pulmonalis wurde das Herz entnommen und vom umliegenden Bindegewebe sowie den Atrien befreit. Es folgte die Trennung und das Wiegen beider Ventrikel. Zwei Drittel der Herzen wurden für molekularbiologische Analysen in Schraubdeckeltubes schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Mit den restlichen Herzen wurde für histologische Untersuchungen wie unter 2.2.6 beschrieben verfahren.

Die Gewichte der Ventrikel wurden zur Bestimmung unterschiedlicher Herzratios herangezogen. Mit diesen ist es möglich, eine Aussage über den Grad der Rechtsherzhypertrophie zu machen.

Folgende Ratios wurden berechnet:

- Rechter Ventrikel (mg) zu linkem Ventrikel plus Septum (mg)
- Rechter Ventrikel (mg) zu Körpergewicht (g)
- Linker Ventrikel (mg) zu Körpergewicht (g)
- Gesamtherzgewicht (mg) zu Körpergewicht (g)

2.2.9 Histologische und immunhistochemische Untersuchungen

2.2.9.1 Vorbereitung zur histologischen Untersuchung

Die in 70% Ethanol gelagerten linken Lungenhälften und Herzen wurden über Nacht im Routineprogramm des geschlossenen Vakuumgewebeinfiltrationsautomaten entwässert. Anschließend wurden sie mit Paraffin in Einbettkassetten eingegossen und auf eine Kühlplatte gelegt, bis das Paraffin gehärtet war und die Wachsböcke aus ihren Formen entnommen werden konnten.

Für alle im Folgenden beschriebenen histologischen Untersuchungsmethoden wurden Schnitte mit einer Dicke von 3 µm angefertigt. Diese wurden nach dem Aufziehen auf die Objektträger zum Trocknen auf eine Heizplatte verbracht und bei 37°C gelagert. Nach dem Färben wurden die Schnitte mit Hilfe eines

computergestützten Analysesystems untersucht. Die jeweils verwendeten Makros wurden von der Firma Leica entwickelt. Alle Schnitte wurden geblindet ausgezählt.

2.2.9.2 Histologische Untersuchung der Lungen

2.2.9.2.1 Muskularisierungsgrad

2.2.9.2.1.1 Färbeprotokoll der Anti- α -Aktin/ von Willebrand Faktor-Färbung

Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte		
60 Minuten	Inkubieren bei 58°C	
3 x 10 Minuten	Xylol	
2 x 5 Minuten	Ethanol absolut 99,6%	
5 Minuten	Ethanol 96%	
5 Minuten	Ethanol 70%	
Färben der Gewebeschnitte		
15 Minuten	Block endogener Peroxidasen	20 ml 30% H ₂ O ₂ in 180 ml Methanol
2x5 Minuten	Waschen	Aqua dest.
2x5 Minuten	Waschen	PBS
10 Minuten	Proteolytische Demaskierung	Trypsin Digest All® 1,5:3
4x5 Minuten	Waschen	PBS
20 Minuten	Blocken unspezifischer Bindungen	10% BSA
3x5 Minuten	Waschen	PBS
30 Minuten	Block nichtspezifischer Bindungen und endogener Maus IgG	Rodent Block M
3x5 Minuten	Waschen	PBS
30 Minuten	Primärantikörper anti-alpha smooth muscle actin	Verdünnung 1:800 mit 10% BSA
4x5 Minuten	Waschen	PBS
20 Minuten	Block nichtspezifischer Bindungen und endogener Maus IgG	MM HPR Polymer
3x5 Minuten	Waschen	PBS
ca. 1-2 Minuten	violettes Chromogen	Vector VIP® Substrat Kit
5 Minuten	Waschen	Leitungswasser
2x5 Minuten	Waschen	PBS
15 Minuten	Blocken unspezifischer Bindungen	10% BSA
3x5 Minuten	Waschen	PBS
20 Minuten	Serumblock	2,5% normal horse Serum ImmPRESS Kit Anti-Rabbit Ig
30 Minuten	Primärantikörper Anti-von Willebrand Faktor	Verdünnung 1:1200 mit 10%BSA
4x5 Minuten	Waschen	PBS
30 Minuten	Biotinylierter Sekundärantikörper	ImmPRESS Kit Anti-Rabbit Ig Peroxidase

4x5 Minuten	Waschen	PBS
ca. 10 Sekunden	Braunes Chromogen	DAB Substrat Kit
5 Minuten	Waschen	Leitungswasser
3 Minuten	Darstellung der Zellkerne	Methylgrün
Dehydrieren der Gewebeschnitte		
1 Minute	Aqua dest.	
2 x 2 Minuten	Ethanol 96%	
2 x 5 Minuten	Isopropylalkohol	
3 x 5 Minuten	Xylol	
Eindecken mit Pertex®		

Die 10-fach konzentrierte phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) wurde wie folgt hergestellt:

- 80 gr NaCl
- 2,0 gr KCl
- 11,5 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
- 2,0 gr KH_2PO_4

gelöst in 900 ml aqua dest

Diese Lösung wurde zu Einmalpuffer verdünnt und mit NaOH ein pH von 7,4 eingestellt.

2.2.9.2.1.2 Morphometrische Analyse des Muskularisierungsgrades

Nach Anfärbung der Paraffinschnitte wie unter 2.2.9.2.1.1 beschrieben wurde der Muskularisierungsgrad der Gefäße analysiert.

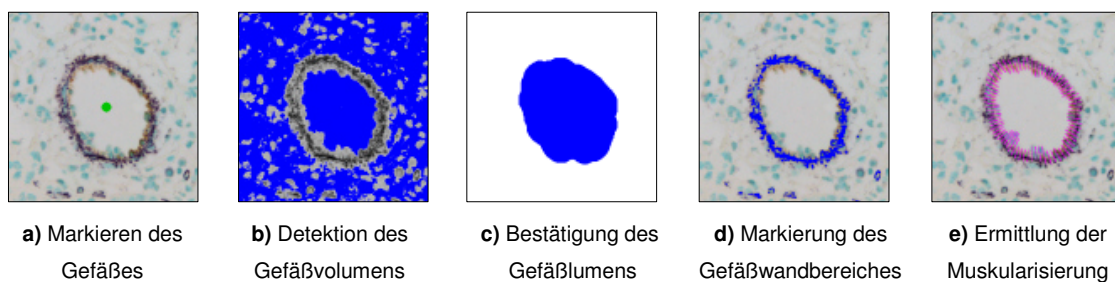


Abbildung 2.2.5: a) - e): Bestimmung des Muskularisierungsgrades

Der sekundäre Antikörper, welcher sich an den anti- α smooth muscle Aktin-Antikörper bindet, färbte die muskularisierten Anteile der Gefäßwand violett an,

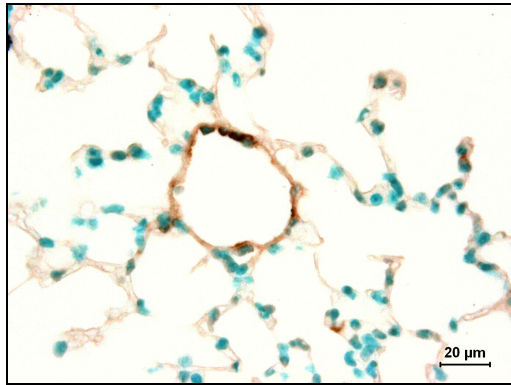
während durch die Anbindung an den anti-von-Willebrand-Faktor das Endothel der Gefäße und somit die nicht-muskularisierten Bereiche der Gefäßwand braun dargestellt wurden. (Abb. 2.2.9.2.1.3)

Zur Bestimmung des Muskularisierungsgrades wurden die Gefäße bei einer 400-fachen Vergrößerung manuell markiert und ihr Innenraum durch den Computer automatisch detektiert (Abb. 2.2.9.2.1.2 a, b). Nach Bestätigung des Lumens (Abb. 2.2.9.2.1.2 c) markierte dieser die Gefäßwand und ermittelte den Anteil der muskularisierten (violetten) Wandbereiche (Abb. 2.2.9.2.1.2 d, e) durch eine kolorimetrisch-spektrometrische Messung. Anschließend wurden die so gemessenen Werte automatisch in Excel (Microsoft Corporation) übertragen.

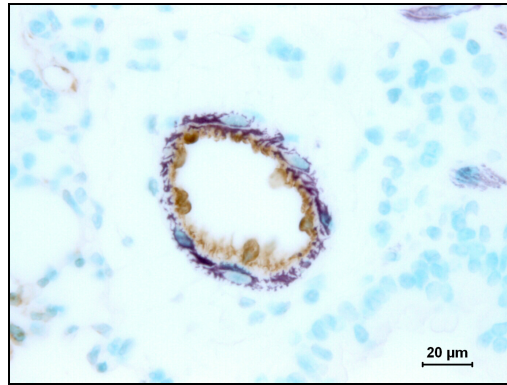
Insgesamt wurden pro Schnitt 85 kleine Gefäße (Gefäßdurchmesser 20-70µm), 10 mittlere Gefäße (>70-150µm) und 5 große Gefäße (>150µm) analysiert. Zur Kategorisierung dieser Gefäße wurde der prozentuale Anteil der mit α -smooth muscle Aktin gefärbten Gefäßmuskelschicht am Gesamtumfang des Gefäßes ermittelt. Dies bedeutet, dass ein zu 100% muskularisiertes Gefäß eine vollständig geschlossene Schicht aus α -smooth muscle Aktin positiven bzw. gefärbten Zellen besitzt.

Die Grenzen zwischen den einzelnen Kategorien wurden folgendermaßen eingeteilt:

- **nicht muskularisiert:** $\leq 5\%$ Anteil von α -smooth muscle Aktin-positiven Bereichen der Gefäßmedia
- **partiell muskularisiert:** $> 5 - \leq 70\%$ Anteil von α -smooth muscle-Aktin positiven Bereichen der Gefäßmedia
- **voll muskularisiert:** $> 70\%$ Anteil von α -smooth muscle Aktin-positiven Bereichen der Gefäßmedia



a)



b)

Abbildung 2.2.6: Beispiel für ein mit anti-alpha Aktin/ anti-von-Willebrand-Faktor gefärbtes a) nicht-muskularisiertes Lungengefäß (braune Wandbereiche) und eines b) voll-muskularisierten Lungengefäß (lila Wandbereiche). (630-fache Vergrößerung)

2.2.9.3 Histologische Untersuchung des Herzens

2.2.9.3.1 Kollagengehalt

2.2.9.3.1.1 Färbeprotokoll der Sirius Red Färbung

Entparaffinieren und Rehydrieren der Gewebeschnitte wie in 2.2.9.2.1.1	
60 Minuten	0,1% Picro Sirius Red Lösung (lichtgeschützt)
3 x 2 Minuten	1% Essigsäure (waschen)
Abspülen	Aqua dest.
Dehydrieren und Eindecken mit Pertex® wie in 2.2.9.2.1.1	

Um die Picro Sirius-Red Lösung herzustellen, wurde 0,2 g Sirius Red in 200 ml Pikrinsäure gelöst und die entstandene Lösung durch ein Filterpapier gegossen. Es wurde ein pH-Wert von 2,0 durch Zugabe von Natronlauge eingestellt.

2.2.9.3.1.2 Analyse des Kollagengehaltes

Zur Analyse des Kollagengehaltes wurden die Längsschnitte der linken und rechten Ventrikel mit Sirius Red wie unter 2.2.9.3.1.1 beschrieben gefärbt. Dabei band sich der Farbstoff an die Kollagenfasern und färbte sie rot, wohingegen das umgebende nicht kollagenhaltige Gewebe gelb dargestellt wurde.

Die Schnitte wurden bei 400-facher Vergrößerung mäanderförmig ausgezählt, wobei nur jedes zweite Bild in jeder zweiten Reihe zur Analyse herangezogen wurde. Dadurch wurden pro rechten und linken Ventrikel größenabhängig 40-60 Bilder

ausgewertet (Abb. 2.2.8), deren ermittelter prozentualen Kollagengehalt vom Computer in Excel übertragen wurde.

Der Mittelwert aller Einzelbilder eines Schnittes ergab den Gesamtkollagengehalt des jeweiligen linken oder rechten Ventrikels.

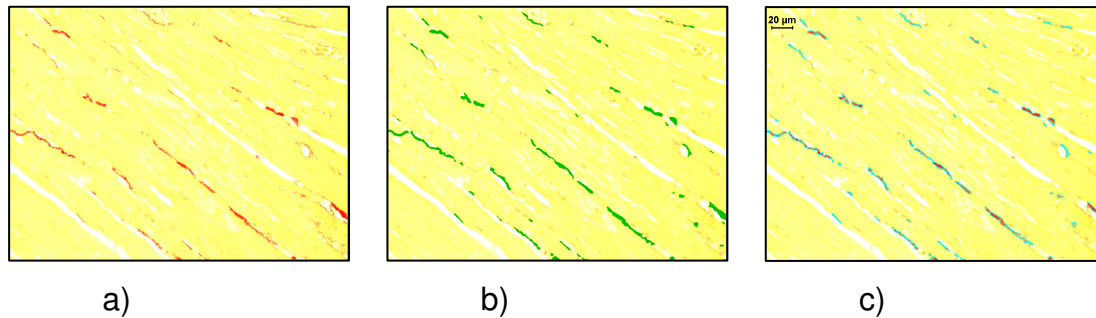


Abbildung 2.2.7: Bestimmung des Kollagengehaltes

a) unbearbeitetes Bild; b) Detektion des Kollagengehaltes; c) gemessener Kollagenanteil

2.2.10 Molekularbiologische Untersuchungen

2.2.10.1 RNA-Isolation, Reinheitsbestimmung und c-DNA-Synthese

Zur Isolation der Ribonukleinsäure (RNA) aus dem Homogenat der entnommenen Lungen und Ventrikel wurde das peqGOLD total RNA Kit verwendet, für die Gefäße wurde das peqgold MicroSpin Total RNA Kit benutzt. Die bei -80°C gelagerten Gewebe wurden bis zur Verwendung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Anschließend wurde ein Drittel des rechten Lungenlappens, die Hälfte des linken Herzens, die kompletten Gefäße sowie der gesamte rechte Ventrikel in 2 ml Schraubverschlussgefäße, die mit 400 µl RNA Lysis Buffer T und ca. 20 Keramikkügelchen (Ø 1,4 mm) gefüllt wurden, verbracht. Die Gewebe wurden im Homogenisator für 2 x 30 Sekunden homogenisiert und die hierbei entstandenen Gewebesuspensionen für 1 Minute bei 10000 x g zentrifugiert. Die Keramikkügelchen und die Zelltrümmer wurden verworfen, der Überstand mit der gelösten RNA wurde nach Protokoll verwendet. Zusätzlich wurde im Falle der rechten Ventrikel ein Desoxyribonuklease (DNase) Verdau durchgeführt.

Nach Isolation wurde die RNA-Konzentration spektrometrisch mittels NanoDrop bestimmt. Es erfolgte ebenfalls eine Reinheitsbestimmung, bei der der Absorptionswert bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen und dessen Quotient ermittelt wurde. Reine Nukleinsäuren zeigen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, während Phenolreste und Proteine, die eine Kontamination darstellen, bei

280 nm ein Absorptionsmaximum haben. Der Quotient der Absorptionswerte reiner RNA liegt zwischen 1,8 und 2,0, im Falle einer Kontamination ist dieser geringer.

Die reverse Transkription zur Herstellung der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA) wurde mittels iScript cDNA-Synthese Kit durchgeführt. Die RNA-Proben wurden auf eine Konzentration von 500 ng verdünnt und mit Hilfe eines Thermozyklers wie folgt umgeschrieben:

- 1 Zyklus bei 25°C für 5 Minuten
- 1 Zyklus bei 42° für 30 Minuten
- 1 Zyklus bei 85°C für 5 Minuten

Die so entstandene DNA wurde für eine real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet.

2.2.10.2 Quantitative real-time Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die real-time PCR wurde verwendet, um Genexpressionsanalysen der Normoxie- und CIH-Tiere durchzuführen. Die Nukleinsäuren werden, wie bei einer herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, vervielfältigt und die gewonnene DNA durch Fluoreszenz-Messungen quantifiziert. Durch Interkalation des verwendeten Farbstoffes in die doppelsträngige DNA entsteht die Fluoreszenz, welche proportional zur Menge der PCR-Produkte zunimmt. Als Farbstoff wurde SYBR[®] Green I im iTaq[™] SYBR[®] Green Supermix with Rox, wie vom Hersteller empfohlen, verwendet. Für eine Reaktion wurden folgende Substanzen gemischt:

- 12,5 µl SYBR Green Supermix
- 0,5 µl Vorwärts-Primer
- 0,5 µl Rückwärts-Primer
- 2,0 µl DNA (Template)
- 9,5 µl steriles *Aqua dest.*

Um die Reaktion auf Spezifität, Verunreinigungen und Primer-Dimere überprüfen zu können, wurde am Ende jedes PCR-Laufs eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei erfolgte durch kontinuierliche Temperaturerhöhung von 55°C bis 95°C ein Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA, welche die Wiederfreisetzung des Farbstoffes zur Folge hatte. Eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen PCR-Produkten ist anhand der unterschiedlichen Schmelztemperatur möglich, da

spezifische Produkte eine größere Fragmentlänge und somit eine höhere Schmelztemperatur als unspezifische Produkte oder Primer-Dimere haben. Jedem PCR-Lauf wurde eine Non-Template-Kontrolle (Negativkontrolle), bestehend aus dem Reaktionsgemisch ohne DANN, zugegeben, um Kontaminationen ausschließen zu können.

Programm des RT-PCR-Laufs:

	<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>	<u>Zyklen</u>
Enzymaktivierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	10 sec	} 40 x
Annealing	59°C	10 sec	
Elongation	72°C	10 sec	
Denaturierung	95°C	1 min	
Schmelzkurve	55°C - 95°C		
Abkühlen	25°C	∞	

Folgende Formel wurde für die Auswertung der real-time PCR verwendet:

$$Ct \text{ (Referenzgen)} - Ct \text{ (untersuchtes Gen)} = \Delta Ct \quad Ct = \text{cycle threshold}$$

Der cycle threshold Wert (Ct-Wert) kennzeichnet den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz angestiegen ist. Die Ct-Werte, welche den Expressionswert der Gene, die aus den Gefäßen gewonnen wurden, angeben wurden zum Wert des Referenz-Gens Beta2-Mikroglobulin (B2M) normalisiert. Die Genexpression der Ventrikel wurden zum Referenz-Gen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) und die Genexpression der Lunge zum Referenzgen β -Aktin normalisiert. Diese Referenz-Gene wurden ausgewählt, da sie in den verwendeten Tiermodellen nicht reguliert werden.

2.2.10.3 Proteinisolierung

Die bei -80°C gelagerten Gewebe wurden bis zur Proteinisolierung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Anschließend wurde ein Drittel des rechten Lungenlappens, die Hälfte des linken Herzens sowie der gesamte rechte Ventrikel in 2 ml

Schraubverschlussgefäße, die mit 150 µl RNA Lysebuffer und ca. 20 Keramikkügelchen gefüllt wurden, verbracht und im Homogenisator für 2 x 30 Sekunden homogenisiert.

Rezept des Lysebuffers:

- 1000 µl Ripa- Puffer
(50 mM Tris, 150 mM NaCl, 60 mM NaN₃, 10 mM CaCl₂, 1% Triton X-100)
- 40 µl Proteaseinhibitor (Complete)
- 5 µl Na-Orthovanadat (200 mM)
- 1 µl PMSF (100 mM)

Danach wurden die Tubes 15 min lang auf Eis gelagert, für 10 min bei 4°C und 10000 x g zentrifugiert und der Überstand in 1,5 ml Eppendorftubes pipettiert

2.2.10.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Proteinmenge der Proben zu bestimmen, wurde das Prinzip des Lowry-Assays verwendet. Hierbei diente eine Standardreihe (0,2 mg/ml - 1,6 mg/ml) aus boviner Serumalbumin (BSA)-Lösung als Referenz sowie purer Ripa-Puffer als Leerwert. Die Proben wurden mit Ripa-Puffer im Verhältnis 1:20 verdünnt und anschließend wurden jeweils 5 µl des Ripa-Puffers (Leerwert), der Standards und der Proteinproben als Doppelansätze in eine 96-well Mikroplatte pipettiert. Folgend wurden die Substanzen des DC Protein Assays von Bio-Rad protokollgemäß hinzugegeben und die Platte in das Lesegerät gestellt. Dieses mischte durch Schütteln die Proben, maß die Absorption bei 750 nm und berechnete so die Proteinkonzentration. Schließlich wurden die Proben bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.10.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei dieser Methode werden die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. In den Gelen befindet sich das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS, engl. sodium dodecyl sulfate), welches die Proteine denaturiert und sich in einem konstanten Gewichtsverhältnis an diese anlagert. Wenn nun an das Gel ein elektrisches Feld angelegt wird, so wandern die Komplexe aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode und werden so aufgetrennt.

Das Gel besteht aus zwei Anteilen, dem Sammelgel (5%) im oberen Bereich mit den Taschen für den Proteinansatz und dem unteren Trenngel (8%), in dem die Proteine nach Anlegen des elektrischen Feldes der Größe nach aufgetrennt werden.

Zusammensetzung der Gele:

	Sammelgel	Trenngel
Gelkonzentration	5%	8%
<i>Aqua dest.</i>	5,7 ml	4,7 ml
30% Acrylamid/Bis.	1,7 ml	2,7 ml
Tris-Puffer	2,5 ml	2,5 ml
10% w/v SDS	0,1 ml	0,1 ml
10% APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Tris-Puffer:

- Trenngel: 1,5 M Tris pH 8,8
- Sammelgel: 0,5 M Tris pH 6,8

Um die Polymerisationsreaktion zu beschleunigen, wurden Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugesetzt.

Vor Beginn der SDS-PAGE wurde den Proben Ripa-Puffer zugegeben, um eine gleiche Proteinkonzentration aller Proben zu erhalten. Danach wurde jedem Ansatz 2,6 µl β-Mercaptoethanol pro 100 µl Probenvolumen (zum Aufspalten von Disulfidbrücken) und 4-fach konzentrierter NuPage LDS Ladepuffer zugefügt. Nach Erhitzen der Proben in einem Heizblock für 10 min bei 99°C wurden diese kurz zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Proteine wurden elektrophoretisch bei 100 Volt, 400 Milliampère und 150 Watt für 90 Minuten in Laufpuffer (Lämmli-Puffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% SDS) aufgetrennt. Zusätzlich wurden 5 µl eines Proteinstandards aufgetragen. Dieser diente als Skala für die Molekülmasse.

2.2.10.6 Western Blot

Zur quantitativen Bestimmung der Proteine mittels spezifischer Antikörper (AK) wurde das Western- bzw. Immunoblotverfahren verwendet. Hierbei werden die Proteine auf eine Membran übertragen. Im Falle des eNOS-AK wurde eine

Nitrocellulose-Membran (NC) für den iNOS-AK eine Polyvenylidendifluorid (PVDF)-Membran verwendet. Dieser Transfer erfolgte elektrophoretisch mit Hilfe eines Semidry-Blot-Systems (eNOS) oder Wet-Blot-Systems (iNOS).

2.2.10.6.1 Semidry-Blot-System

Membran und Whatman-Filter wurden zunächst auf eine Größe von 8,5 x 5,5 cm zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde dann mit Methanol aktiviert und in Transferpuffer (2,9 g Glycin, 5,8 g Tris, 1,85 ml 20% SDS, 200 ml Methanol, mit A. dest auf 1 Liter auffüllen) gelegt, die NC-Membran und die Filter kamen direkt in Transferbuffer. Nun wurden Filter, Membran und das SDS-Gel folgendermaßen übereinandergelegt (Aufbau von unten nach oben):

- 3x Filter
- Membran
- Gel
- 3x Filter

Anschließend wurden die Stromkabel so angelegt, dass die negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld von oben nach unten (vom Minuspol zum Pluspol) wanderten. Die Übertragung dauerte 75 Minuten bei 100 Volt, 115 Milliampère und 150 Watt.

2.2.10.6.2 Wet-Blot-System

Hierbei wurde die Membran ebenfalls aktiviert und in Transferbuffer gelegt, wie unter 2.2.10.6.1 beschrieben. Die Membran, die Filter und das Gel wurden in einer speziellen Halterung in eine mit Transferbuffer gefüllte Elektrophoresekammer gestellt. Dabei muss folgende Reihenfolge beachtet werden (von unten nach oben):

- Schwamm
- Filter
- Membran
- Gel
- Filter
- Schwamm

Anschließend wurde die Kammer auf einen Magnetrührer gestellt und ein Kühlakku hinzugegeben, was eine bessere Temperaturhomogenität gewährleisten und die Entstehung eines Ionengradienten verhindern sollte.

Nun wurde das Stromkabel angelegt und das Gel mit 100 Volt, 400 Milliampère und 150 Watt für 75 min auf die Membran übertragen.

Im Folgenden wurde bei beiden Methoden die Membran eine Stunde lang in 6% (w/v) Milchpuffer (Skim Milk-Pulver gelöst in TBST) geblockt, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (gelöst in 6% (w/v) Milchpuffer) erfolgte über Nacht bei 4°C.

Am Folgetag wurde die Membran für 4 x 10 Minuten in TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20) gewaschen und danach für eine Stunde im Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (gelöst in 6% (w/v) Milchpuffer) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran wieder in TBST (3-5x für 10 Minuten) gewaschen und für 5 min dem Peroxidase-Substrat ECL Plus ausgesetzt. Hierbei reagiert die Peroxidase, welche an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, mit dem ECL Plus Substrat unter Erzeugung einer Chemilumineszenz. Nun konnten mehrere Chemilumineszenzfilme für die Zeitdauer von 1 sec bis zu 15 Minuten auf die Membran gelegt werden und mit Hilfe einer Entwicklermaschine entwickelt werden.

Zur Auswertung wurden die Filme mit dem Bio-Imaging System fotografiert und letztendlich mit einer Software von Gene-Tools densitometrisch quantifiziert.

Um die Membran wiederverwenden zu können, war es notwendig, diese zunächst zu „strippen“. Hierbei wurde die Membran für eine Stunde in den Strippingpuffer (90 ml *Aqua dest.*, 10 ml 1 M Glycin, 2-3 ml HCl 37%) gelegt, welcher die gebundenen Antikörper entfernt („strippen“). Nun wurde die Membran erneut mit TBST (4 x 10 Minuten) gewaschen und in 6% (w/v) Milchpuffer für eine Stunde geblockt. Es folgte die Inkubation mit neuen Primär- und Sekundärantikörper sowie die Entwicklung der Membran, wie oben beschrieben.

2.2.11 Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit angegebenen Graphen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad PRISM Version 5.01 (GraphPad Software, Inc., 2236 Avenida de la Playa, La Jolla, CA 92037 USA) erstellt und die Ergebnisse damit statistisch analysiert. Für die Dezimaltrennzeichen der y-Achsenbeschriftungen verwendet das Programm Punkte, anstatt Kommata, was an seinem internationalen Ursprung (USA) liegt. Die

Darstellung und die Auswertung des Blutdruckverlaufes erfolgte mit Hilfe des Programmes „R“ (**RCoreTeam** 2013). Alle Daten wurden als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die n-Zahl der jeweiligen Gruppen entspricht, soweit nicht anders angegeben, der in Kapitel 2.2.1.1 „Aufteilung der Tiergruppen“ angegebenen Tierzahlen. Die Normalverteilung wurde getestet. Bei einer Normalverteilung wurden die Unterschiede zwischen den verschiedenen Mäusegruppen, soweit nicht anders angegeben, durch Varianzanalyse und einen Student-Newman-Keuls *post-hoc* Test für multiple Vergleiche ermittelt. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant angesehen. Zur Angabe der Signifikanzniveaus wurde, soweit nicht anders angegeben, folgendes Symbol „*“ verwendet. Dabei entspricht * $p<0,05$; ** $p<0,01$ und *** $p<0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Das Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie und seine Einflüsse auf die WT, eNOS und iNOS KO Mäuse

3.1.1 Oxymetrische Messungen

Zur Überprüfung, ob der Stimulus der CIH mit denen für diese Arbeit festgelegten Parametern (länge Nox/Hox, Sauerstoffkonzentration während der Hypoxiephase) zur Erzeugung einer ähnlichen starken Entsättigung, wie beim Menschen mit OSAS, ausreicht, wurden oxymetrische Messungen durchgeführt. Diese Messungen ergaben bei allen untersuchten Tieren eine signifikante Verringerung der Sauerstoffsättigung während der hypoxischen Phasen. Dieser Verringerung schloss sich eine Normalisierung der Sauerstoffsättigung in jedem normoxischen Zyklus an. Die Herzfrequenz der Mäuse zeigte eine Erhöhung unter hypoxischen Bedingungen sowie eine repetitive Erniedrigung während jeder normoxischen Phase. Diese Entwicklung konnte auch bei der Atemfrequenz beobachtet werden (Abb. 3.1.1) und kann als kompensatorischer Reaktion auf die Hypoxie erklärt werden. Allerdings zeigte sich bei den iNOS KO Mäusen in Zyklus 12 (Abb. 3.1.2) und bei den eNOS KO Mäusen in Zyklus 4 und 12 (Abb. 3.1.3) eine leichte Abweichung von dieser Norm.

Der Mittelwert der Sauerstoffsättigung unter Normoxie und der sich daran anschließende Mittelwert aller Entsättigungen war bei allen drei Mäusegruppen ähnlich stark ausgeprägt und zeigte keinen signifikanten Unterschied. So war bei den WT Mäusen unter Normoxie eine Sauerstoffsättigung von $93,7 \pm 1,0\%$ und unter Hypoxie von $53,8 \pm 1,4\%$ sowie bei den KO Tieren ein normoxischer Wert von $93,1 \pm 1,7\%$ (iNOS) und $93,9 \pm 1,1\%$ (eNOS) und ein hypoxischer Mittelwert von $56,7 \pm 1,6\%$ (iNOS) und $53,2 \pm 1,0\%$ (eNOS) zu beobachten. Hierzu sind die einzelnen Werte in den Tabellen 3.1.1, 3.1.2 und 3.1.3 aufgeführt.

3.1.1.1 C57BL/6J Mäuse

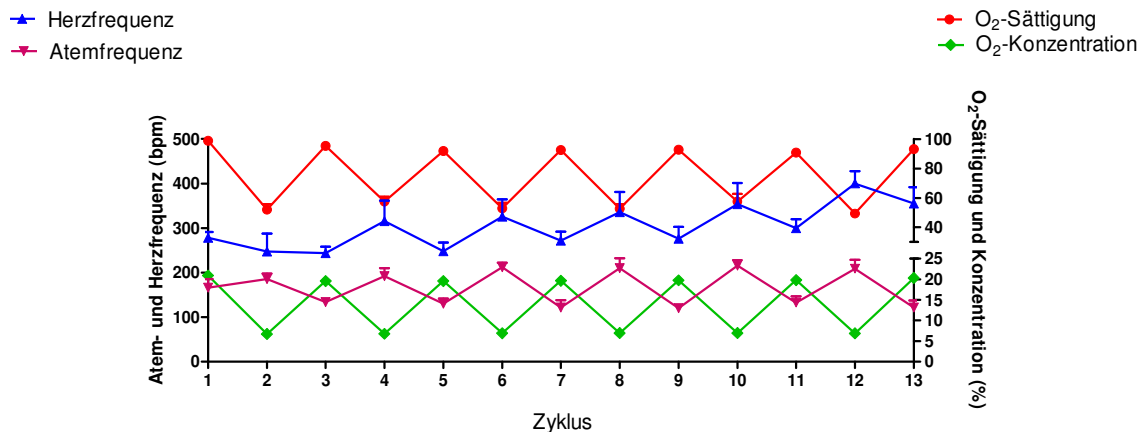


Abbildung 3.1.1: Darstellung der Entwicklung von Atemfrequenz, Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung der WT Mäuse unter CIH (n=5).

bpm=Schläge pro Minute

Zur besseren Übersicht werden die einzelnen Werte in Tabelle 3.1.1 aufgeführt.

WT n=5	Sauerstoffsättigung (%)		Herzfrequenz (bpm)		Atemfrequenz (bpm)	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
Zyklus 1 Nox	99	0,3	278	14	166	20
Zyklus 2 Hox	52	3,6	248	40	186	12
Zyklus 3 Nox	95	2,1	244	14	134	8
Zyklus 4 Hox	58	3,3	316	46	192	18
Zyklus 5 Nox	92	2,4	248	19	130	11
Zyklus 6 Hox	53	3,7	326	38	212	10
Zyklus 7 Nox	93	0,7	272	20	122	16
Zyklus 8 Hox	53	3,0	336	45	210	22
Zyklus 9 Nox	93	1,5	276	27	120	10
Zyklus 10 Hox	58	5,1	354	48	216	12
Zyklus 11 Nox	91	1,5	300	20	133	14
Zyklus 12 Hox	49	2,8	400	28	209	20
Zyklus 13 Nox	93	2,4	355	37	121	17

Tabelle 3.1.1: Werte der oxymetrisch gemessenen Sauerstoffsättigung, Herzfrequenz und Atemfrequenz der WT Mäuse. Alle Werte sind als Maximalwert (Normoxie) bzw. Minimalwert (Hypoxie) angegeben.

Nox=Normoxie, Hox=Hypoxie, bpm=Schläge pro Minute

3.1.1.2 iNOS^{-/-} Mäuse

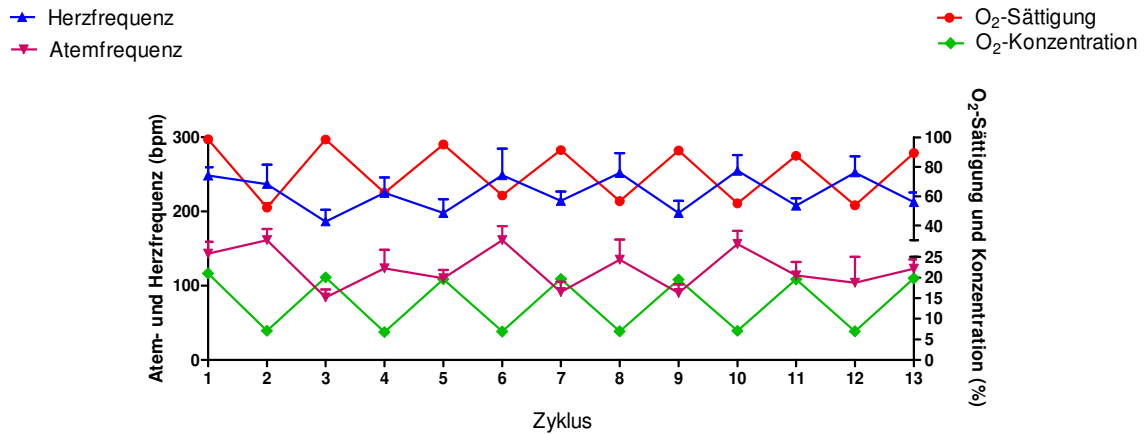


Abbildung 3.1.2: Darstellung der Entwicklung von Atemfrequenz, Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung der iNOS KO Mäuse unter CIH (n=5).

bpm=Schläge pro Minute

Folgend die Werte in tabellarischer Form:

iNOS n=5	Sauerstoffsättigung (%)		Herzfrequenz (bpm)		Atemfrequenz (bpm)	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
Zyklus 1 Nox	99	0,2	249	11	143	16
Zyklus 2 Hox	52	3,2	237	26	162	15
Zyklus 3 Nox	99	0,2	187	16	84	11
Zyklus 4 Hox	62	0,7	225	21	123	25
Zyklus 5 Nox	95	1,3	198	19	110	11
Zyklus 6 Hox	60	1,8	249	36	161	19
Zyklus 7 Nox	91	2,0	215	12	92	14
Zyklus 8 Hox	57	2,5	252	27	135	27
Zyklus 9 Nox	91	2,1	198	17	90	12
Zyklus 10 Hox	55	1,3	255	21	156	18
Zyklus 11 Nox	88	1,5	208	10	114	18
Zyklus 12 Hox	54	0,7	253	22	104	35
Zyklus 13 Nox	89	2,9	213	13	123	13

Tabelle 3.1.2: Werte der oxymetrisch gemessenen Sauerstoffsättigung, Herzfrequenz und Atemfrequenz der iNOS KO Mäuse. Alle Werte sind als Maximalwert (Normoxie) bzw. Minimalwert (Hypoxie) angegeben.

Nox=Normoxie, Hox=Hypoxie, bpm=Schläge pro Minute

3.1.1.3 eNOS^{-/-} Mäuse

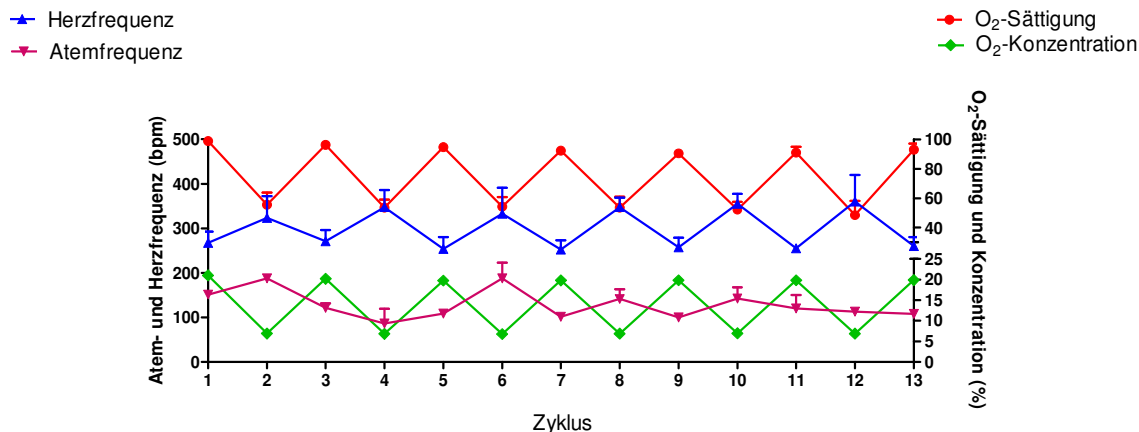


Abbildung 3.1.3: Darstellung der Entwicklung von Atemfrequenz, Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung der eNOS KO Mäuse unter CIH (n=4).

bpm=Schläge pro Minute

Bei den eNOS KO Mäusen ergaben sich die in Tabelle 3.1.3 aufgeführten Werte.

eNOS n=4	Sauerstoffsättigung (%)		Herzfrequenz (bpm)		Atemfrequenz (bpm)	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
Zyklus 1 Nox	99	0,3	268	25	151	5
Zyklus 2 Hox	56	8,2	324	49	188	3
Zyklus 3 Nox	96	0,9	271	25	121	10
Zyklus 4 Hox	54	5,6	348	39	86	30
Zyklus 5 Nox	95	0,9	254	26	109	8
Zyklus 6 Hox	54	6,5	333	59	188	32
Zyklus 7 Nox	92	1,1	253	21	101	1
Zyklus 8 Hox	54	7,5	348	21	141	20
Zyklus 9 Nox	91	2,3	258	22	100	7
Zyklus 10 Hox	52	5,4	355	22	143	22
Zyklus 11 Nox	91	4,0	255	5	120	30
Zyklus 12 Hox	49	9,5	360	60	113	3
Zyklus 13 Nox	93	4,0	260	20	108	8

Tabelle 3.1.3: Werte der oxymetrisch gemessenen Sauerstoffsättigung, Herzfrequenz und Atemfrequenz der eNOS KO Mäuse. Alle Werte sind als Maximalwert (Normoxie) bzw. Minimalwert (Hypoxie) angegeben.

Nox=Normoxie, Hox=Hypoxie, bpm=Schläge pro Minute

Zur besseren Vergleichbarkeit werden die Mittelwerte der Sauerstoffsättigung unter Normoxie und CIH aller 3 Mauslinien nochmals in Abbildung 3.1.4 dargestellt.

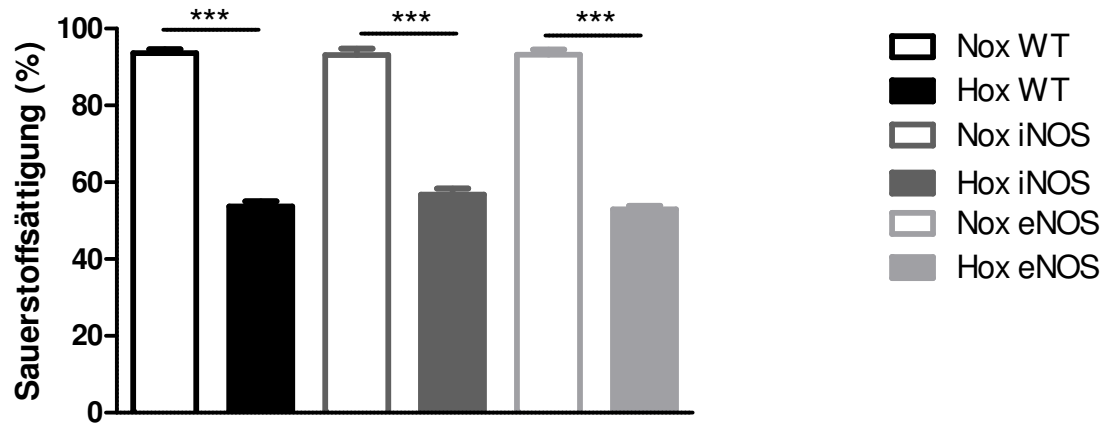


Abbildung 3.1.4: Darstellung der Sauerstoffsättigung von allen drei Mauslinien unter Normoxie und CIH (WT und iNOS KO n=5, eNOS KO n=4).
Nox=Normoxie, Hox=Hypoxie

3.1.2 Auswirkungen der Exposition in chronisch intermittierender Hypoxie

Während der Versuchsdauer zeigten die Mäuse ein ungestörtes Allgemeinbefinden, eine normale Futter- und Wasseraufnahme sowie ein physiologisches Putzverhalten.

3.1.2.1 Gewicht

Das Ausgangsgewicht der WT Mäuse lag mit einem Mittelwert von $22,5 \pm 0,3$ gr und einem Bereich von 20-27 gr etwas unter dem Gewicht der iNOS KO (24-28 gr; Mittelwert: $25,7 \pm 0,2$ gr) und eNOS KO (22,5-29,5 gr; Mittelwert $25,2 \pm 0,3$ gr) Mäuse (Abb. 3.1.5 a). Die Gewichtsänderung der Tiere wird aufgrund der stark abweichenden Ausgangsgewichte (20-30 gr) in Prozent angegeben. Hierbei entsprechen 0% dem Gewicht der Tiere zu Beginn des Versuches und die in Abb. 3.1.5 b dargestellten Werte der Änderung des Gewichtes von diesem Ausgangswert. Alle Mäuse wurden täglich gewogen, zur besseren Darstellung wurden allerdings nur die Änderungen nach 6 Wochen CIH- bzw. Normoxieexposition aufgeführt.

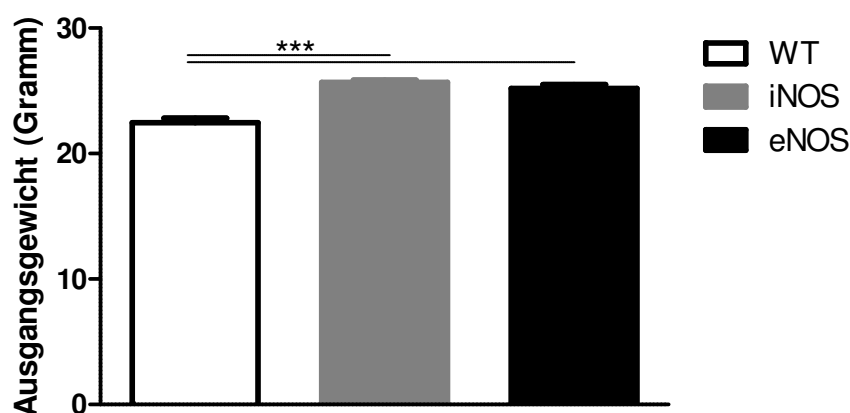


Abbildung 3.1.5 a): Darstellung des Ausgangsgewichts der WT, iNOS und eNOS KO Mäuse

*** $p < 0,001$.

WT=C57BL/6J

Alle Mäuse der CIH-Gruppen zeigten nach 6 Wochen eine signifikant geringere Gewichtszunahme (WT) bzw. eine Gewichtsabnahme (KO) als die korrespondierenden Kontrolltiere. Die Differenz der Mittelwerte zwischen den normoxischen und CIH-exponierten Mäusen betrug bei den WT-Tieren 11,5%, bei den iNOS KO Mäusen 11,1% und bei den eNOS KO Mäusen 11,0%. Die WT-

Mäuse, die unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden, erreichten eine Gewichtszunahme von $21,6 \pm 1,4\%$, die iNOS KO Mäuse von $5,4 \pm 1,0\%$ und die eNOS KO Mäuse von $3,0 \pm 1,0\%$, wohingegen bei den CIH-exponierten WT-Tieren eine Gewichtsänderung von $10,1 \pm 1,1\%$, bei den iNOS KO Mäusen von $-5,6 \pm 0,8\%$ und bei den eNOS KO Mäusen von $-7,9 \pm 0,8\%$ gemessen werden konnte (Abb. 3.1.5 b).

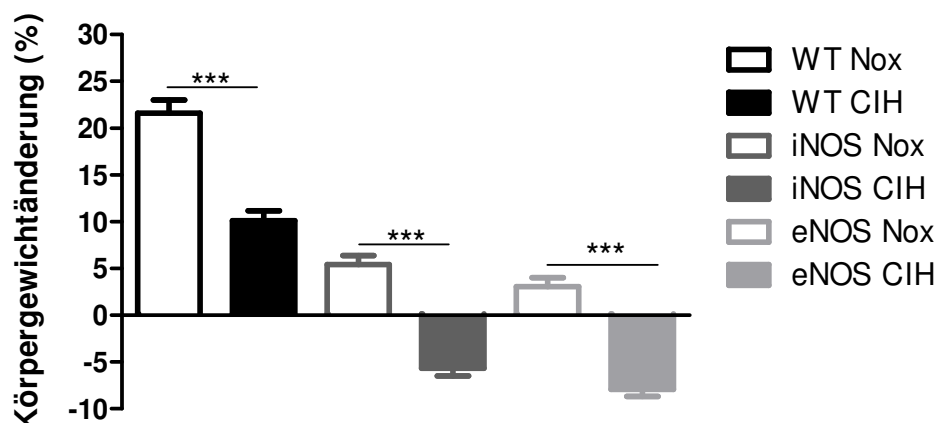


Abbildung 3.1.5 b): Darstellung der prozentualen Gewichtsänderung nach 6 Wochen CIH-bzw. Normoxieexposition *** $p < 0,001$.
Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

Um die physiologischen Reaktionen der Mäuse auf den Stimulus der CIH charakterisieren zu können, wurde den Tieren täglich der Blutdruck gemessen sowie am Versuchsende der Hämatokrit, das Ausmaß der Herzhypertrophie sowie der RVSP bestimmt. Als Maß für die Rechtsherzhypertrophie wurden hierbei die Ratios von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum sowie die Ratio von rechtem Ventrikel zum Körpergewicht bestimmt, wohingegen die Ratio von linkem Ventrikel zum Körpergewicht als Maß für die Entwicklung einer Linksherzhypertrophie gewertet wurde.

3.1.2.2 Hämatokrit

Am Versuchsende betrug der Hämatokrit (HTK) bei den normoxischen WT Tieren $44,0 \pm 0,4$, bei den iNOS KO Mäusen $43,5 \pm 1,1$ und bei den eNOS KO Mäusen $42,4 \pm 1,0$. Die CIH-exponierten WT Tiere zeigten dazu einen signifikant höheren Hämatokrit von $49,9 \pm 0,6$, die iNOS KO Mäuse von $49,4 \pm 0,9$ und die eNOS KO Mäuse von $49,6 \pm 0,8$ (Abb. 3.1.6).

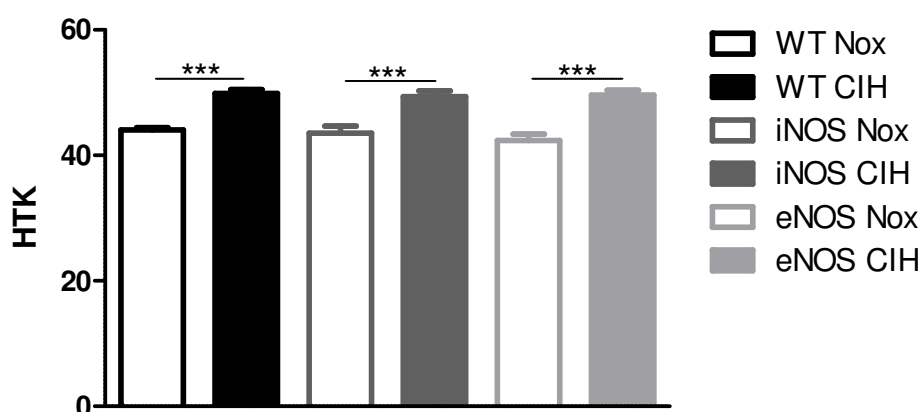


Abbildung 3.1.6: Darstellung des Hämatokritwertes der WT, iNOS und eNOS KO Mäuse

*** $p < 0,001$.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

3.1.3 Ratio rechter Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum

Die Ratio des Nassgewichtes von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum ($RV/(LV+S)$) ermöglicht es, den Grad der Rechtsherzhypertrophie zu bestimmen. Bei den normoxischen WT und eNOS KO Mäusen betrug die Ratio gleichermaßen $0,239 \pm 0,005$, bei den iNOS KO Mäusen $0,250 \pm 0,004$. Im Verlauf der 6 Wochen CIH-Exposition entwickelten die WT Mäuse eine signifikante Rechtsherzhypertrophie ($0,296 \pm 0,009$), die durch die erhöhte Druckbelastung des rechten Ventrikels erklärt werden kann. Die iNOS KO Mäuse ($0,262 \pm 0,003$) und eNOS KO Mäuse ($0,245 \pm 0,005$), die den Bedingungen der CIH ausgesetzt waren, zeigten dagegen keinen signifikanten Anstieg der Herzratio (Abb. 3.1.7).

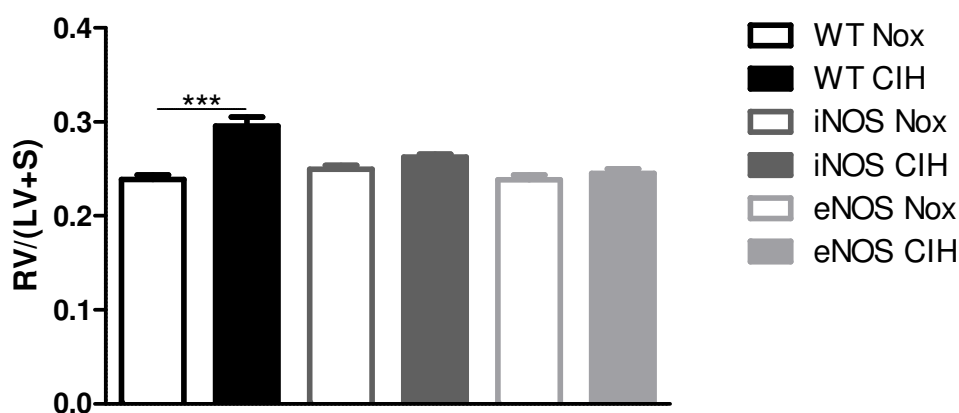


Abbildung 3.1.7: Darstellung der Ratio von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus

Septum. *** $p < 0,001$.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

3.1.4 Ratio von rechtem Ventrikel zu Körpergewicht

Um Einflüsse durch den linken Ventrikel zu vermeiden, wurde zusätzlich zur Herzratio das Verhältnis von rechtem Ventrikel zum Körpergewicht errechnet. Die so ermittelte Rechtsherzhypertrophie der WT Mäuse stimmte mit der unter Kapitel 3.1.3 errechneten Ratio überein. Zusätzlich war eine signifikante Erhöhung der Ratios beider eNOS-Gruppen zu beobachten. Normoxische WT Mäuse zeigten eine Ratio von $0,82 \pm 0,01$, iNOS KO Mäuse von $0,82 \pm 0,02$ und eNOS KO Mäuse von $0,87 \pm 0,01$. Bei den CIH-exponierten WT Mäusen betrug der Quotient $0,87 \pm 0,02$ und bei den eNOS KO Mäusen $0,88 \pm 0,02$, während die iNOS KO Tiere mit $0,83 \pm 0,01$ keinen Anstieg des Wertes zeigten (Abb. 3.1.8).

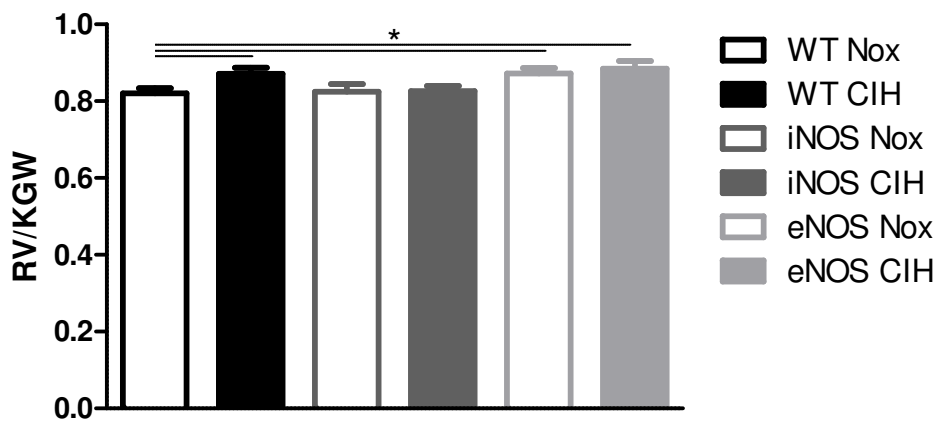


Abbildung 3.1.8: Darstellung der Ratio von rechtem Ventrikel zum Körpergewicht * $p < 0,05$, ermittelt durch student t-Test.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

3.1.5 Ratio von linkem Ventrikel zu Körpergewicht

Als Maß zur Bestimmung der Linksherzhypertrophie diente die Ratio des Nassgewichts des linken Ventrikels zum Körpergewicht. Normoxische und CIH-exponierte WT ($3,28 \pm 0,03$ vs. $3,18 \pm 0,02$) und iNOS KO Mäuse ($3,24 \pm 0,04$ vs. $3,28 \pm 0,04$) zeigten hierbei keine Veränderung der Ratio, wohingegen das Verhältnis des Gewichtes vom linken Ventrikel zum Körpergewicht bei normoxischen und CIH-exponierten eNOS KO Mäusen ($3,61 \pm 0,04$ vs. $3,58 \pm 0,07$) signifikant erhöht war (Abb. 3.1.9).

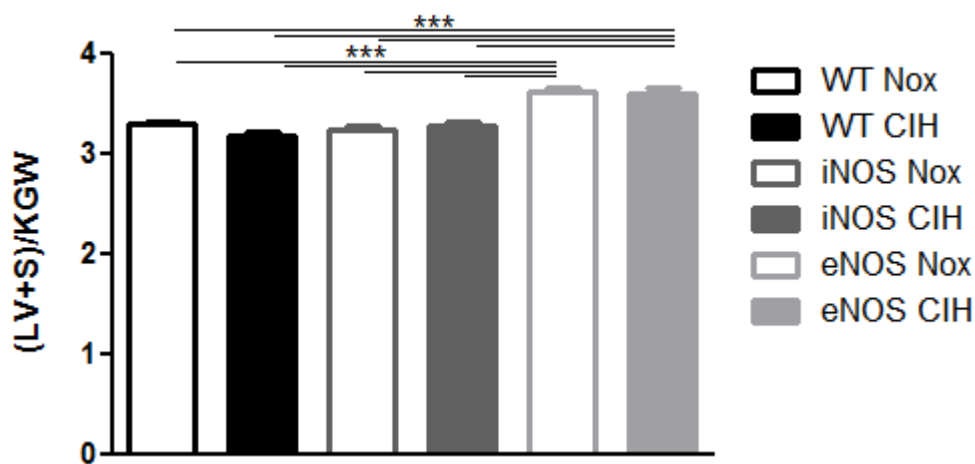


Abbildung 3.1.9: Darstellung der Ratio von linkem Ventrikel plus Septum zu Körpergewicht
 $***p < 0,001$.
 Nox Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J, KGW=Körpergewicht

3.1.6 Ratio Herzgewicht zu Körpergewicht

Das Verhältnis von gesamtem Herzgewicht zum Körpergewicht wurde ermittelt, um Aussagen über die Vorgänge am Herzen unter CIH-Exposition zu machen. Hierbei zeigten sich die gleichen Veränderungen wie unter Kapitel 3.1.5 beschrieben. Bei den normoxischen WT Mäusen betrug die Ratio $4,14 \pm 0,04$, bei den iNOS KO Mäusen $4,09 \pm 0,05$ und bei den CIH-exponierten WT Mäusen $4,07 \pm 0,03$ sowie bei den iNOS KO Mäusen $4,14 \pm 0,06$. Die eNOS KO Mäuse zeigten dagegen eine signifikant höhere Ratio von $4,46 \pm 0,04$ in Normoxie bzw. $4,44 \pm 0,08$ unter Bedingungen der CIH (Abb. 3.1.10).

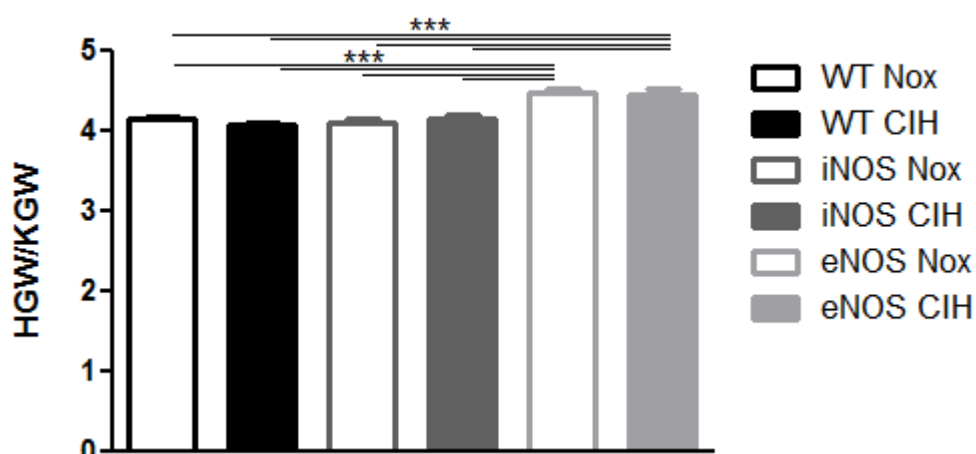


Abbildung 3.1.10: Darstellung der Ratio vom Gesamtherzgewicht zum Körpergewicht *** $p < 0,001$.
 Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J, HGW=Herzgewicht,
 KGW=Körpergewicht

3.1.7 Blutdrücke in den einzelnen Gruppen

Die Messung des systolischen und diastolischen Blutdruckes erfolgte in dem Zeitraum, in dem die Mäuse nicht unter den Bedingungen der CIH oder Normoxie gehalten wurden (10-12 Stunden am Tag) an jedem Tag der CIH- oder Normoxieexposition. Der Blutdruck wurde in einminütigen Abständen gemessen und aufgezeichnet. Zur Auswertung des Blutdruckes wurde an jedem Messtag der Mittelwert aller aufgezeichneten Drücke einer Maus berechnet. Vor Exposition der Mäuse erfolgte eine 24-48 stündige Messung des Blutdruckes um den Ausgangswert jedes Tieres ermitteln zu können. Aufgrund dieser individuell abweichenden Blutdruckwerte und der dadurch entstehenden Varianz wird die Blutdruckänderung der Tiere zum Anfangswert angegeben. Weiterhin ist in diesem Schaubild auch die Modellvorhersage mit dem 95%-Konfidenzbereich angegeben. Der Parameter der Zeit wurde durch eine quadratische Funktion gefittet, da es sich hierbei um die einfachstmögliche Art der Abbildung aller Schaubilder handelt. Diese Darstellung wurde immer in den mit a) gekennzeichneten Abbildungen verwendet. Zur Verdeutlichung der Blutdruckentwicklung wurde eine zweite Darstellung der Daten (genannt b) gewählt. Hierbei wurden die Mittelwerte von allen Mäusen einer Gruppe für den Zeitraum der ersten und der letzten Woche zusammengefasst.

3.1.7.1 Systolischer Blutdruck

Die CIH-exponierten WT Mäuse zeigten ab einem Zeitraum von zwei Wochen einen Anstieg des systolischen Blutdruckes, welcher anhand des Auseinanderdriftens der Konfidenzbänder der beiden Gruppen zu erkennen ist. Dieser signifikante Anstieg im Blutdruck setzt sich bis zum Ende der Studie fort, wohingegen bei den normoxischen Tieren ein Abfall des Blutdruckes über den Zeitraum von sechs Wochen zu sehen ist (Abb. 3.1.11 a).

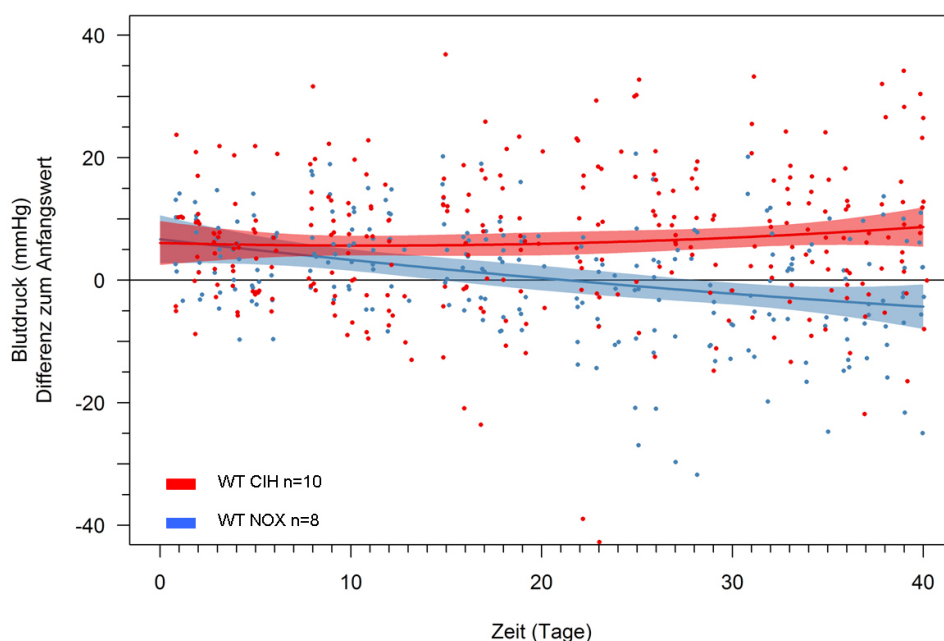


Abbildung 3.1.11 a): Darstellung der Entwicklung des systolischen Blutdrucks der WT Mäuse unter CIH.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

Punkte: Blutdruckwert der Tiere als Differenz zum Anfangswert; Linien und Balken: Mittelwert der Blutdruckwerte mit 95%-Konfidenzbereich.

Der Blutdruckmittelwert aller normoxischen WT Mäuse betrug in der ersten Woche $119,2 \pm 0,7$ mmHg und der Mittelwert der letzten Woche $114,2 \pm 1,4$ mmHg und war somit signifikant niedriger. Die CIH-exponierten Mäuse zeigten in der ersten Woche einen Mittelwert von $121,5 \pm 0,8$ mmHg und in der letzten Woche einen signifikant höheren Wert von $127,0 \pm 1,8$ mmHg (Abb. 3.1.11 b).

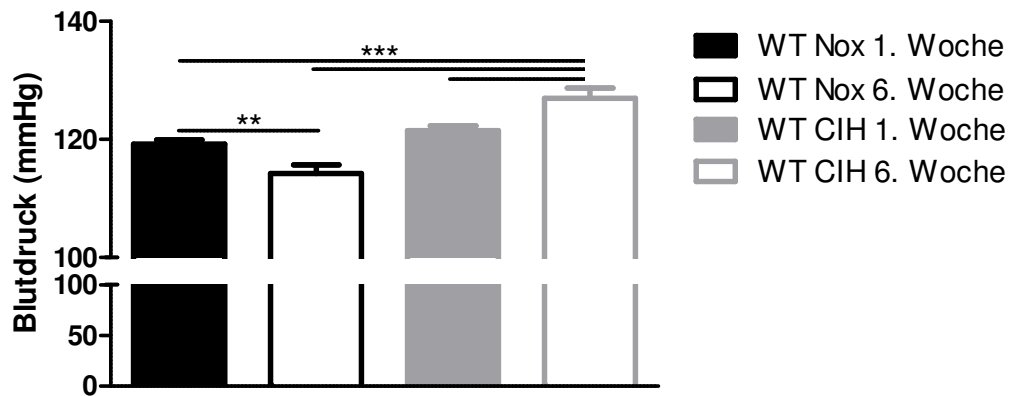


Abbildung 3.1.11 b): Systolische Blutdrücke der WT Mäuse in der ersten und letzten Woche (WT CIH n=10, WT Nox n=8) **p<0,01, ***p<0,001.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

Bei den CIH-exponierten iNOS KO Mäusen war im Vergleich zu den normoxischen Kontrolltieren keine Veränderung der Konfidenzbänder und somit auch des Blutdruckes zu beobachten (Abb. 3.1.12 a).

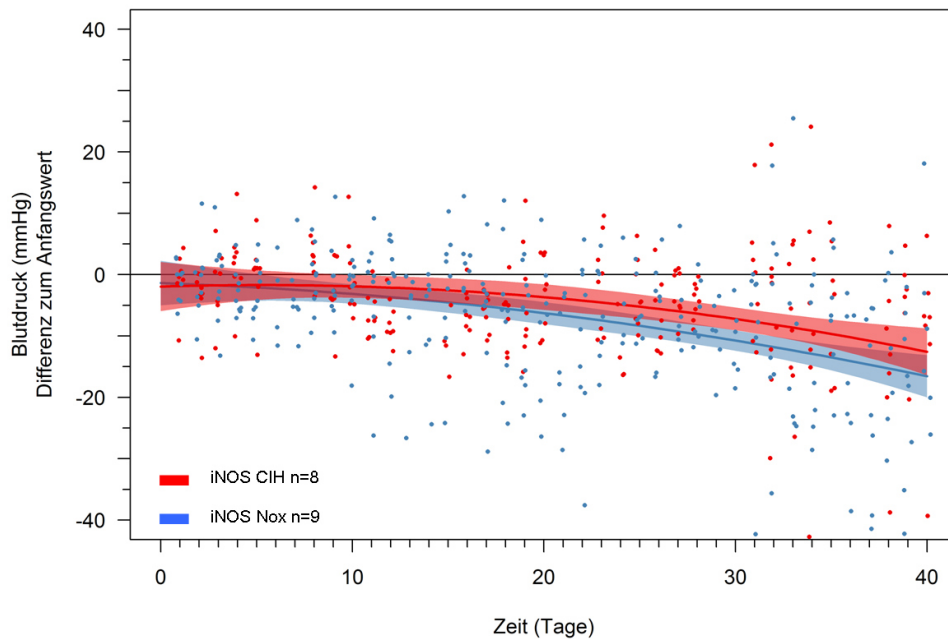


Abbildung 3.1.12 a): Darstellung der Entwicklung des systolischen Blutdrucks der iNOS KO Mäuse unter CIH.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie

Punkte: Blutdruckwert der Tiere als Differenz zum Anfangswert; Linien und Balken: Mittelwert der Blutdruckwerte mit 95%-Konfidenzbereich.

Der Blutdruck der normoxischen iNOS KO Mäuse betrug in der ersten Woche $123,9 \pm 0,7$ mmHg und in der letzten Woche $112,0 \pm 2,3$ mmHg und war somit signifikant niedriger. Die CIH-exponierten iNOS KO Mäuse zeigten in der ersten Woche einen Blutdruckmittelwert von $128,1 \pm 0,6$ mmHg und in der sechsten Woche einen signifikant niedrigeren Wert von $116,8 \pm 3,4$ mmHg. Weiterhin war der Anfangsblutdruck der normoxischen iNOS KO Mäuse signifikant niedriger als der der CIH-exponierten Mäuse (Abb. 3.1.12 b).

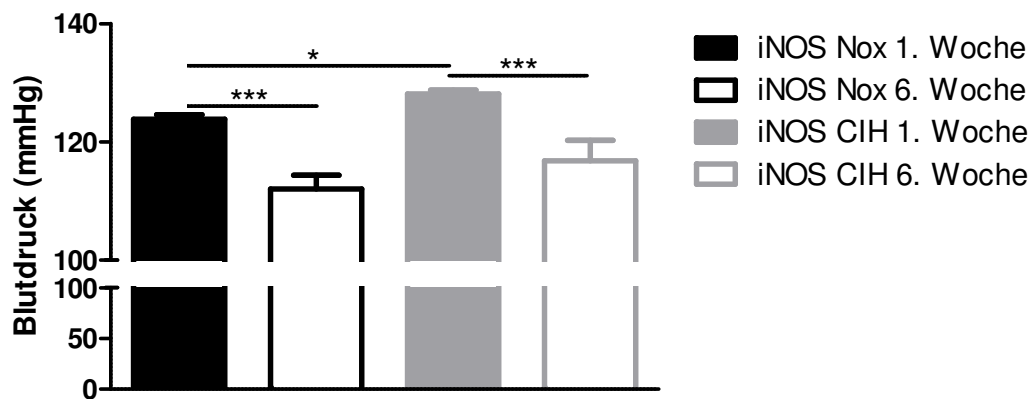


Abbildung 3.1.12 b): Systolische Blutdrücke der iNOS KO Mäuse in der ersten und letzten Woche (iNOS CIH n=8, iNOS Nox n=9) *p<0,05, ***p<0,001.
Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie

Die CIH-exponierten eNOS KO Mäuse zeigten im Vergleich zu den normoxischen Kontrolltieren zu Beginn der Studie (Tag 7-22) signifikante Unterschiede in der Blutdruckentwicklung. Bis Tag 11-12 war ein geringer Anstieg des systolischen Blutdruckes zu beobachten dem sich ein starker Blutdruckabfall anschloss. Die normoxischen eNOS KO Mäuse zeigten über den Zeitraum von sechs Wochen einen fast geradlinigen Abfall des systolischen Blutdruckes (Abb. 3.1.13 a).

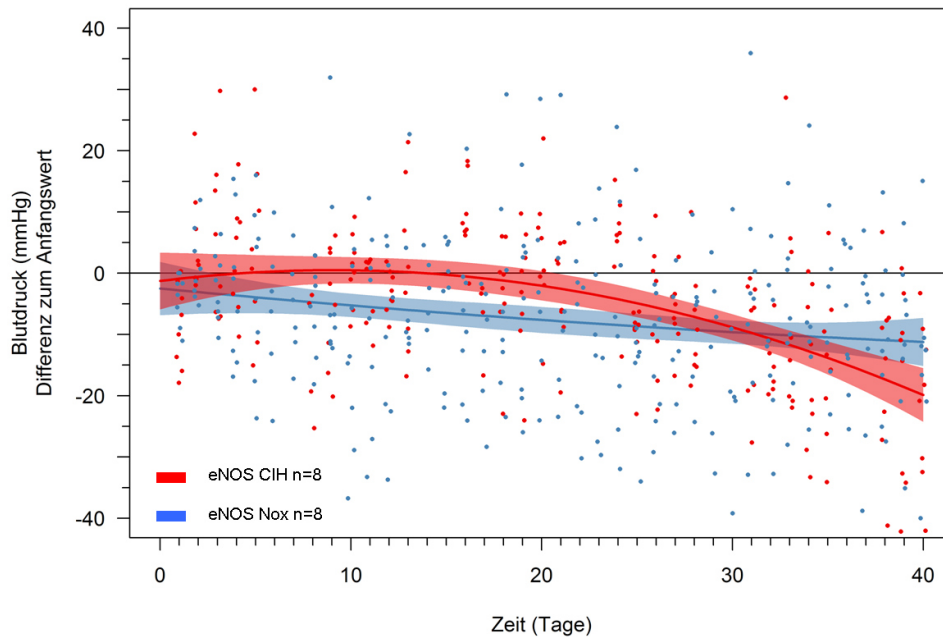


Abbildung 3.1.13 a): Darstellung der Entwicklung des systolischen Blutdrucks unter CIH der eNOS KO Mäuse.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie

Punkte: Blutdruckwert der Tiere als Differenz zum Anfangswert; Linien und Balken: Mittelwert der Blutdruckwerte mit 95%-Konfidenzbereich.

Alle eNOS KO Mäuse zeigten von Versuchsbeginn an einen erhöhten diastolischen Blutdruck verglichen mit den WT Tieren. Der Blutdruck der normoxischen eNOS KO Mäuse betrug in der ersten Woche $153,7 \pm 1,0$ mmHg und in der sechsten Woche $145,1 \pm 1,9$ womit dieser signifikant erniedrigt war. Die CIH-exponierten eNOS KO Mäuse zeigten in der ersten Woche einen Blutdruckmittelwert von $154,3 \pm 1,3$ mmHg und in der letzten Woche einen signifikant niedrigeren Wert von $134,7 \pm 2,3$ mmHg. Weiterhin war der Mittelwert der letzten Woche bei den normoxischen Tieren signifikant höher als bei den CIH-exponierten Tieren (Abb. 3.1.13 b).

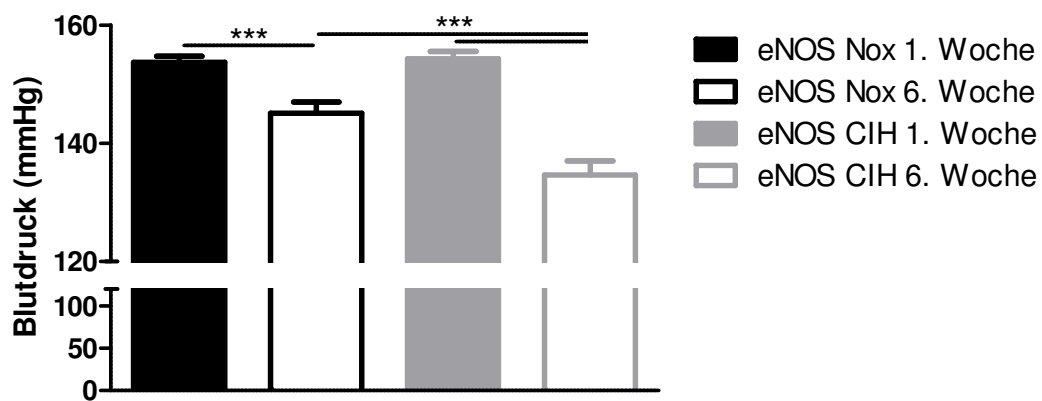


Abbildung 3.1.13 b): Systolische Blutdrücke der eNOS KO Mäuse in der ersten und letzten Woche (eNOS CIH n=8, eNOS Nox n=8) ***p<0,001.
Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie

3.1.7.2 Diastolischer Blutdruck

Ab Tag 7 bis hin zum Ende des Versuches zeigten die CIH-exponierten WT Mäuse im Vergleich zu den normoxischen WT Mäusen einen signifikanten Unterschied in der Entwicklung des diastolischen Blutdruckes (Abb. 3.1.14 a).

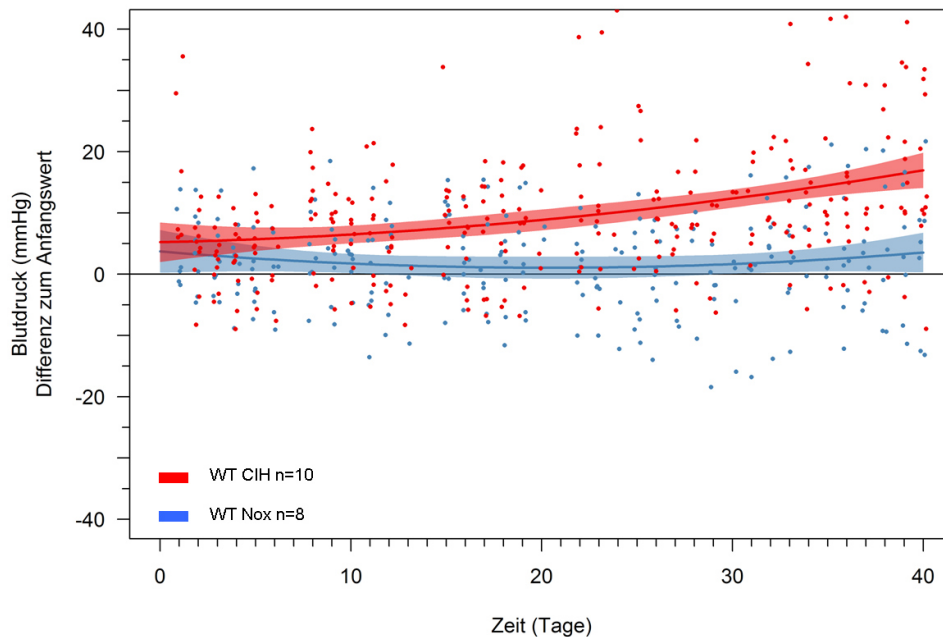


Abbildung 3.1.14 a): Darstellung der Entwicklung des diastolischen Blutdrucks der WT Mäuse unter CIH.
Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J
Punkte: Blutdruckwert der Tiere als Differenz zum Anfangswert; Linien und Balken: Mittelwert der Blutdruckwerte mit 95%-Konfidenzbereich.

Der Blutdruckmittelwert aller normoxischen WT Mäuse betrug in der ersten Woche $89,3 \pm 0,9$ mmHg und der Mittelwert der letzten Woche $92,2 \pm 1,5$ mmHg. Die CIH-exponierten Mäuse zeigten in der ersten Woche einen Blutdruck von $90,2 \pm 0,9$ mmHg und in der sechsten Woche einen signifikant höheren Mittelwert von $104,9 \pm 2,2$ mmHg (Abb. 3.1.14 b).

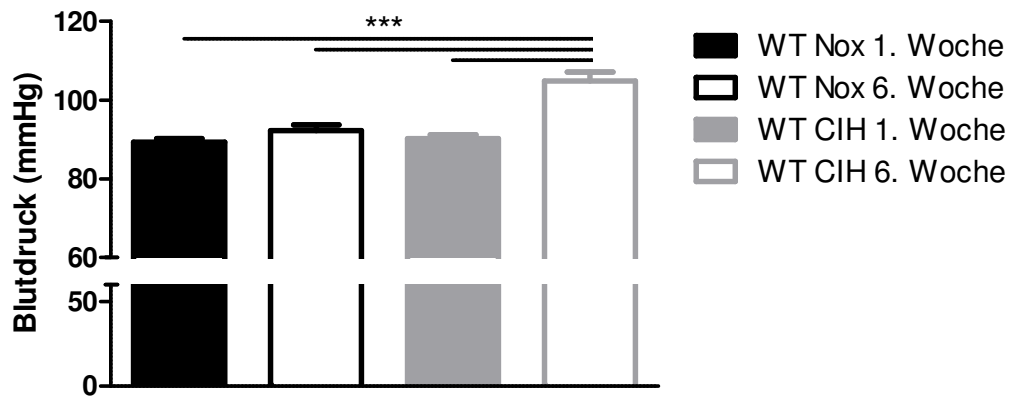


Abbildung 3.1.14 b): Diastolische Blutdrücke der WT Mäuse in der ersten und letzten Woche (WT CIH n=10, WT Nox n=8) ***p<0,001.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

Bei den CIH-exponierten iNOS KO Mäusen war im Vergleich zu den normoxischen Kontrolltieren kein diastolischer Blutdruckanstieg zu beobachten (Abb. 3.1.15 a).

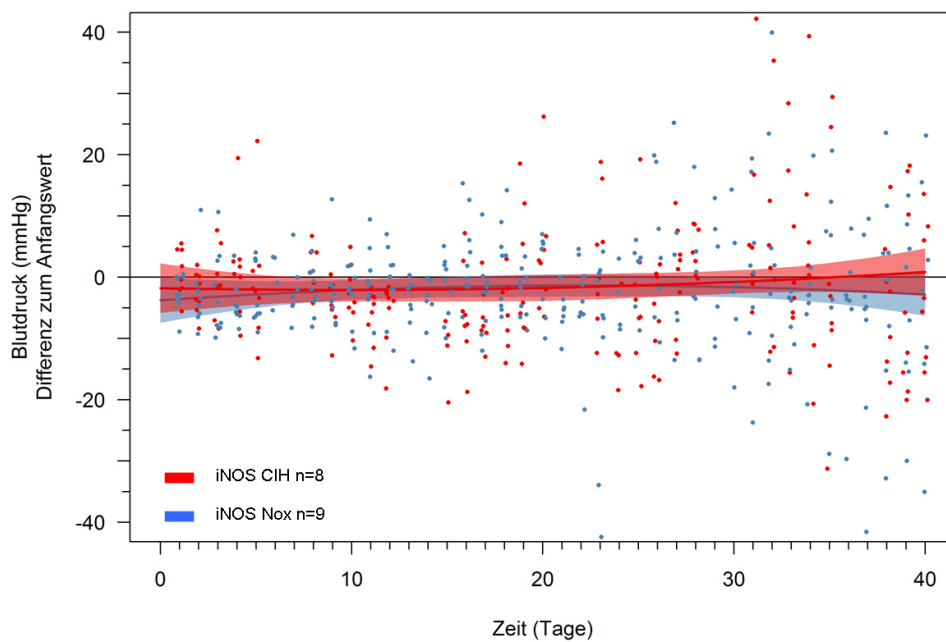


Abbildung 3.1.15 a): Darstellung der Entwicklung des diastolischen Blutdrucks der iNOS KO Mäuse unter CIH.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie

Punkte: Blutdruckwert der Tiere als Differenz zum Anfangswert; Linien und Balken: Mittelwert der Blutdruckwerte mit 95%-Konfidenzbereich.

Der diastolische Blutdruckmittelwert der normoxischen iNOS KO Mäuse betrug in der ersten Woche $92,1 \pm 0,6$ mmHg und in der letzten Woche $94,2 \pm 2,1$ mmHg. Die CIH-exponierten iNOS KO Mäuse zeigten in der ersten Woche einen Blutdruckmittelwert von $97,2 \pm 0,8$ mmHg und in der sechsten Woche einen Wert von $96,6 \pm 2,6$ mmHg. Weiterhin war der Blutdruck der normoxischen iNOS KO Mäuse signifikant niedriger als der der CIH-exponierten Mäuse (Abb. 3.1.15 b).

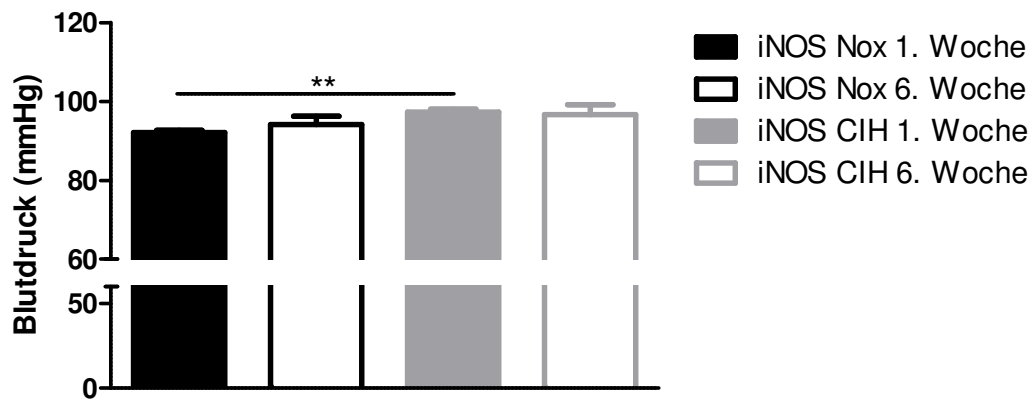


Abbildung 3.1.15 b): Diastolische Blutdrücke der iNOS KO Mäuse in der ersten und letzten Woche (iNOS CIH n=8, iNOS Nox n=9) **p<0,01.
Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie

Die CIH-exponierten eNOS KO Mäuse zeigten im Vergleich zu den normoxischen Kontrolltieren zu Beginn der Studie (Tag 8-31) signifikante Unterschiede in der Blutdruckentwicklung. Bis Tag 21 war ein Anstieg des diastolischen Blutdruckes zu beobachten dem sich ein Blutdruckabfall anschloss. Die normoxischen eNOS KO Mäuse zeigten über den Zeitraum von drei Wochen einen leichten Abfall des diastolischen Blutdruckes dem, über weitere drei Wochen, ein Blutdruckanstieg folgte (Abb. 3.1.16 a).

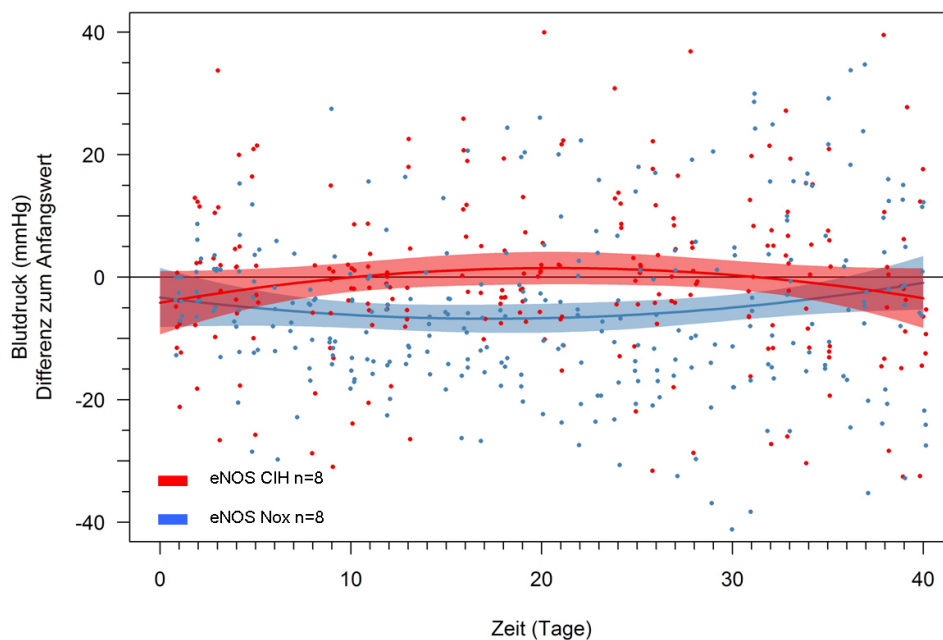


Abbildung 3.1.16 a): Darstellung der Entwicklung des diastolischen Blutdrucks der eNOS KO Mäuse unter CIH.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie

Punkte: Blutdruckwert der Tiere als Differenz zum Anfangswert; Linien und Balken: Mittelwert der Blutdruckwerte mit 95%-Konfidenzbereich.

Alle eNOS KO Mäuse zeigten von Versuchsbeginn an einen erhöhten diastolischen Blutdruck verglichen mit den WT Tieren. Der diastolische Blutdruck der normoxischen eNOS KO Mäuse betrug in der ersten Woche $113,3 \pm 1,2$ mmHg und in der sechsten Woche $114,1 \pm 2,3$ mmHg. Die CIH-exponierten eNOS KO Mäuse zeigten in der ersten Woche einen Blutdruckmittelwert von $114,2 \pm 1,3$ mmHg und in der letzten Woche einen Wert von $110,7 \pm 2,9$ mmHg (Abb. 3.1.16 b).

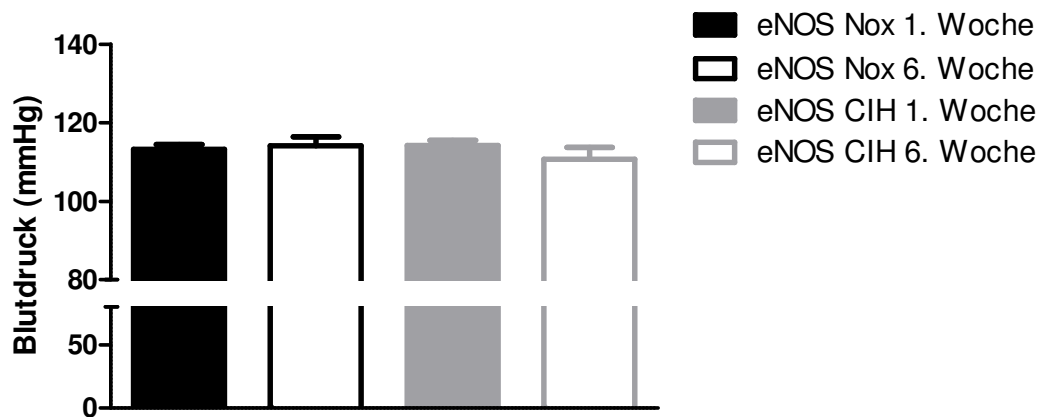


Abbildung 3.1.16 b): Diastolische Blutdrücke der eNOS KO Mäuse in der ersten und letzten Woche (eNOS CIH n=8, eNOS Nox n=8).

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie

3.1.7.3 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Die CIH-exponierten WT Mäuse zeigten im Vergleich zu den normoxischen WT Mäusen ab Tag 21 eine signifikant unterschiedliche Entwicklung des MAP. Bei den CIH-exponierten WT Mäusen war ab Tag 7 bis zum Ende des Versuches hin ein Anstieg des MAP zu erkennen. Bei den normoxischen WT Mäusen hingegen fiel der Blutdruck leicht auf das Niveau des Anfangswertes ab (Abb. 3.1.17 a).

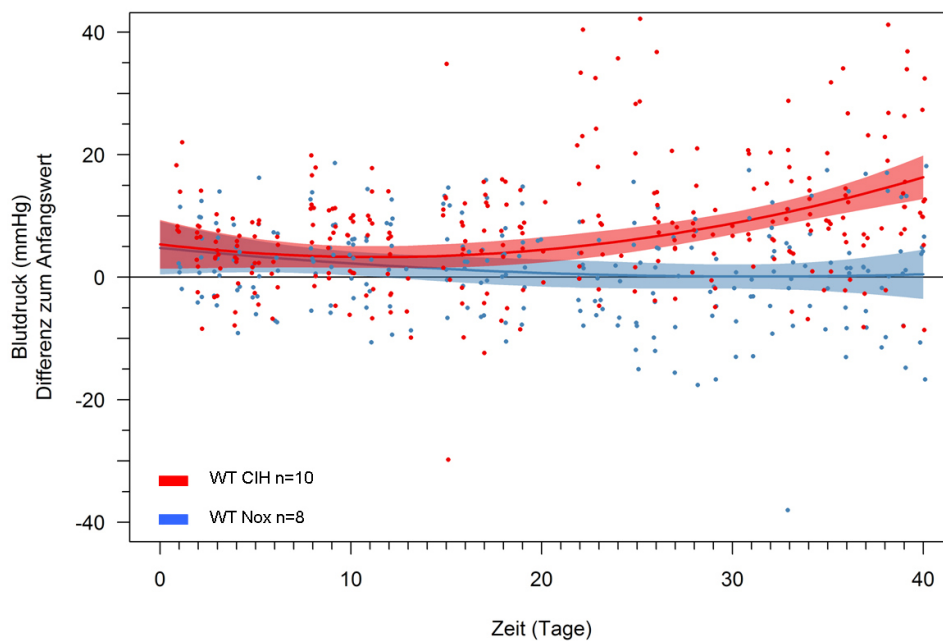


Abbildung 3.1.17 a): Darstellung der Entwicklung des MAP der WT Mäuse unter CIH.
Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J
Punkte: Blutdruckwert der Tiere als Differenz zum Anfangswert; Linien und Balken: Mittelwert der Blutdruckwerte mit 95%-Konfidenzbereich.

Der Blutdruckmittelwert aller normoxischen WT Mäuse betrug in der ersten Woche $99,2 \pm 0,8$ mmHg und der Mittelwert der letzten Woche $99,6 \pm 1,4$ mmHg. Die CIH-exponierten Mäuse zeigten in der ersten Woche einen Blutdruck von $100,3 \pm 0,8$ mmHg und in der sechsten Woche einen signifikant höheren Mittelwert von $113,0 \pm 2,1$ mmHg (Abb. 3.1.17 b).

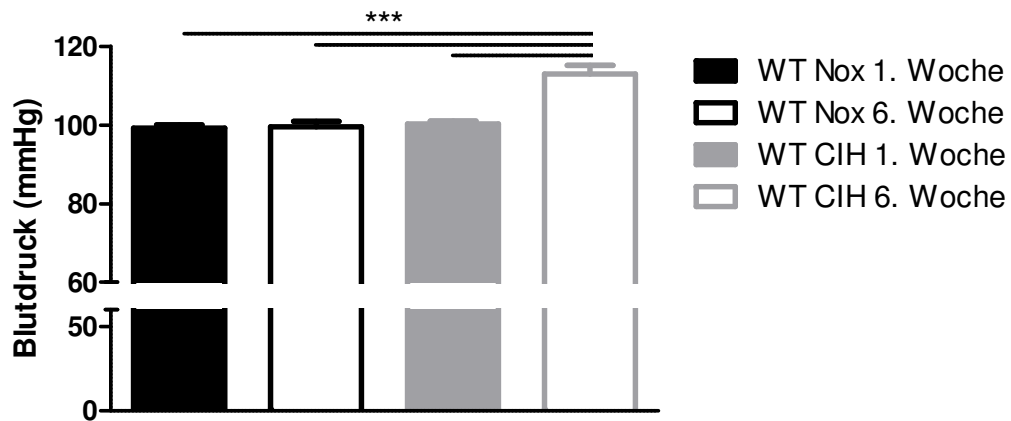


Abbildung 3.1.17b): MAP der WT Mäuse in der ersten und letzten Woche (WT CIH n=10, WT Nox n=8) ***p<0,001.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

Bei den CIH-exponierten iNOS KO Mäusen war im Vergleich zu den normoxischen Kontrolltieren keine Veränderung im MAP zu beobachten (Abb. 3.1.18 a).

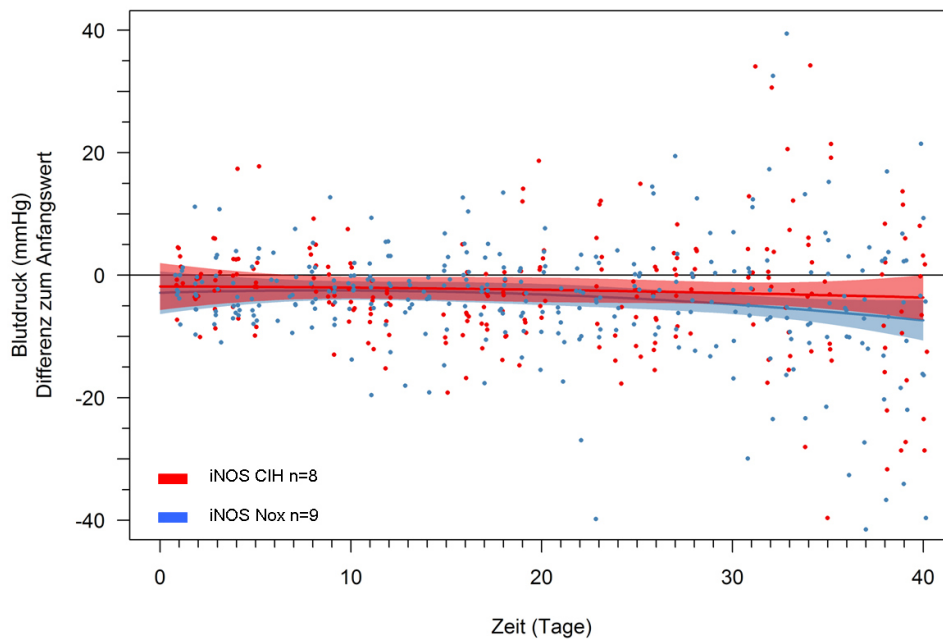


Abbildung 3.1.18 a): Darstellung der Entwicklung des MAP der iNOS KO Mäuse unter CIH.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie

Punkte: Blutdruckwert der Tiere als Differenz zum Anfangswert; Linien und Balken: Mittelwert der Blutdruckwerte mit 95%-Konfidenzbereich.

Der Blutdruckmittelwert der normoxischen iNOS KO Mäuse betrug in der ersten Woche $102,7 \pm 0,6$ mmHg und in der letzten Woche $100,1 \pm 2,1$ mmHg. Die CIH-exponierten iNOS KO Mäuse zeigten in der ersten Woche einen Blutdruckmittelwert von $107,5 \pm 0,7$ mmHg und in der sechsten Woche einen Wert von $103,4 \pm 2,8$ mmHg. Weiterhin war der Blutdruck der normoxischen iNOS KO Mäuse signifikant niedriger als der der CIH-exponierten Mäuse (Abb. 3.1.18 b).

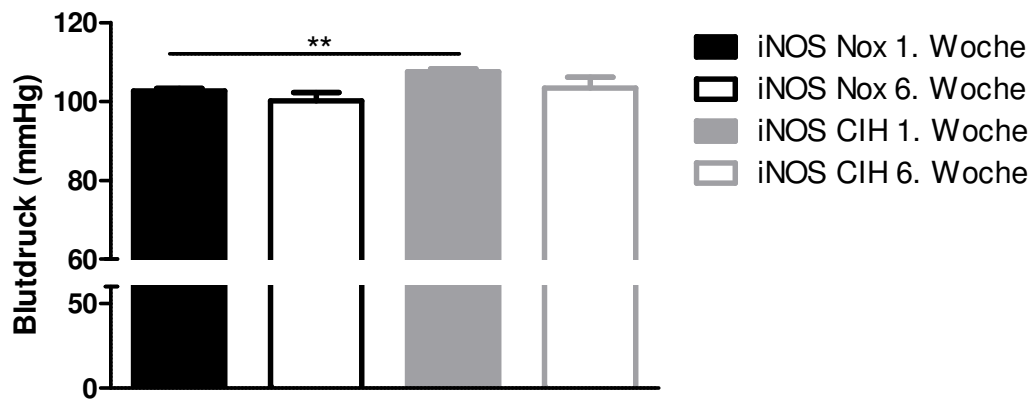


Abbildung 3.1.18 b): MAP der iNOS KO Mäuse in der ersten und letzten Woche (iNOS CIH n=8, iNOS Nox n=9) **p<0,01.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie

Die CIH-exponierten eNOS KO Mäuse zeigten im Vergleich zu den normoxischen Kontrolltieren zu Beginn der Studie (Tag 8-29) signifikante Unterschiede in der Blutdruckentwicklung. Bis Tag 17-18 war ein geringer Anstieg des MAP zu beobachten dem sich ein starker Blutdruckabfall anschloss. Die normoxischen eNOS KO Mäuse zeigten über den Zeitraum von drei Wochen ein Abfall des diastolischen Blutdruckes, dem über weitere drei Wochen ein Blutdruckanstieg folgte (Abb. 3.1.19 a).

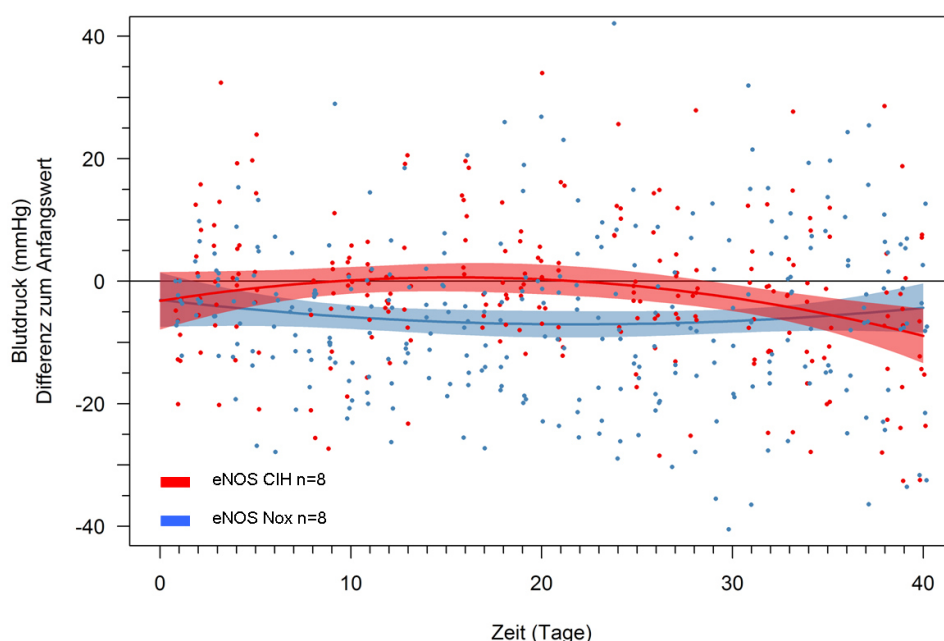


Abbildung 3.1.19 a): Darstellung der Entwicklung des MAP der eNOS KO Mäuse unter CIH. Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie
Punkte: Blutdruckwert der Tiere als Differenz zum Anfangswert; Linien und Balken: Mittelwert der Blutdruckwerte mit 95%-Konfidenzbereich.

Alle eNOS KO Mäuse zeigten von Versuchsbeginn an einen erhöhten MAP (siehe Abb. 3.1.20). Der Blutdruck der normoxischen eNOS KO Mäuse betrug in der ersten Woche $126,7 \pm 1,1$ mmHg und in der sechsten Woche $124,5 \pm 1,9$ mmHg. Die CIH-exponierten eNOS KO Mäuse zeigten in der ersten Woche einen Blutdruckmittelwert von $127,6 \pm 1,3$ mmHg und in der letzten Woche einen signifikant niedrigeren Wert von $118,7 \pm 2,7$ mmHg. Weiterhin war der Mittelwert der letzten Woche bei den normoxischen Tieren signifikant höher als bei den CIH-exponierten Tieren (Abb. 3.1.19 b)).

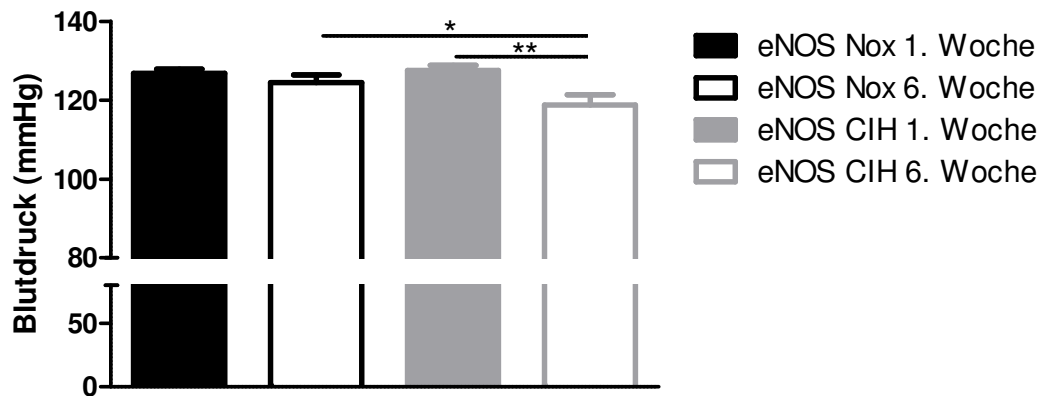


Abbildung 3.1.19 b): MAP der eNOS KO Mäuse in der ersten und letzten Woche (eNOS CIH n=8, eNOS Nox n=8) *p<0,05, **p<0,01.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie

3.1.7.4 Mittlerer arterieller Blutdruck im Vergleich

Wie bereits unter 3.1.10.1-3 erwähnt, zeigten die eNOS KO Mäuse zu Beginn der Studie sowie über die gesamten sechs Wochen einen signifikant höheren systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdruck als die WT und iNOS KO Mäuse. Zur Verdeutlichung dieses Ergebnisses wurden die normoxischen Mittelwerte des MAPs aller drei Mauslinien, die während der ersten und letzten Woche gemessen wurden, in einem Schaubild zusammengefasst (Abb. 3.1.20).

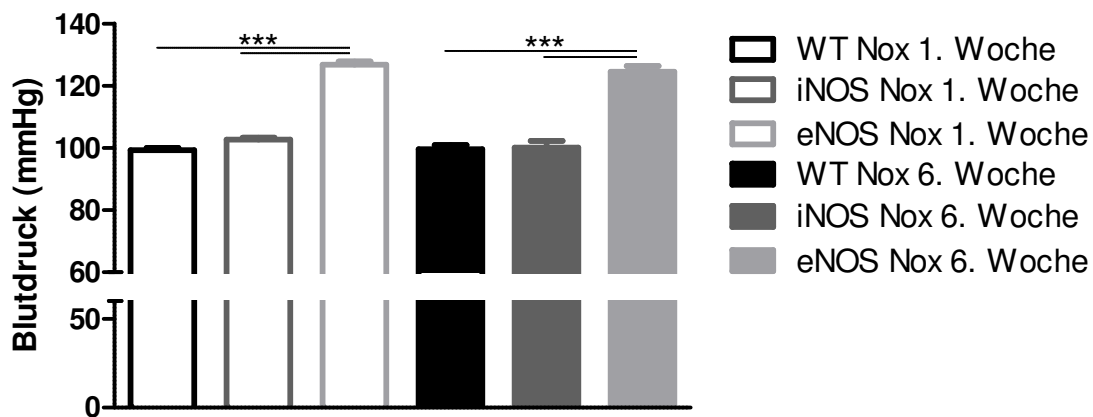


Abbildung 3.1.20: Vergleichende Darstellung des MAP aller 3 Mauslinien (WT n=10, iNOS KO n=9, eNOS KO n=8) ***p<0,001.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

3.1.7.5 Systolischer rechtsventrikulärer Druck (RVSP)

Um Bestimmen zu können, ob die Mäuse unter CIH eine pulmonalen Hypertonie entwickeln, erfolgte nach sechswöchiger CIH- bzw. Normoxieexposition die Messung des RVSP. Dabei zeigten die CIH-exponierten WT Mäuse einen signifikant höheren RVSP ($25,5 \pm 0,5$ mmHg) als ihre Kontrollen ($23,4 \pm 0,5$ mmHg) wohingegen bei den eNOS KO Mäusen mit $25,3 \pm 0,5$ mmHg (Normoxie) und $24,5 \pm 0,3$ mmHg (CIH) kein signifikanter Unterschied zu erkennen war. Interessanterweise wiesen die iNOS KO Mäuse unter Normoxie einen erhöhten RVSP ($25,6 \pm 0,7$ mmHg) auf, der sich unter CIH-Exposition ($23,3 \pm 0,6$ mmHg) signifikant verringerte (Abb. 3.1.29).

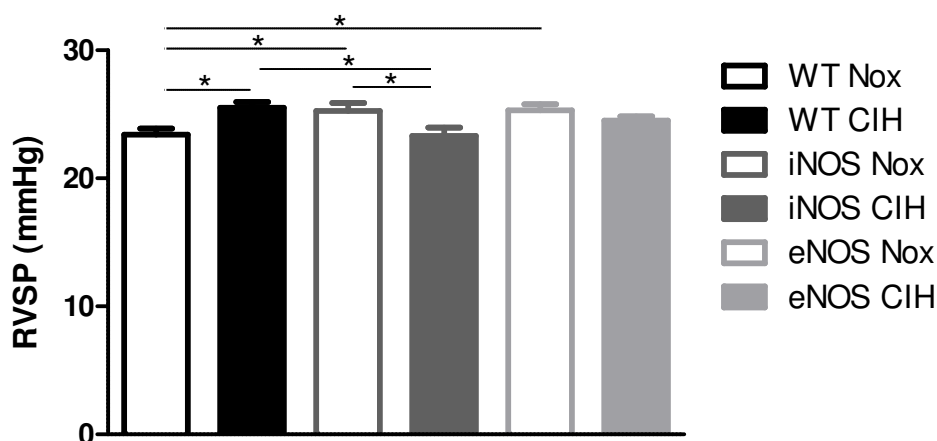


Abbildung 3.1.21: Darstellung des RVSP aller 3 Mauslinien (WT Nox n=13, CIH n=15; iNOS Nox n=13, CIH n=12; eNOS je n=13) *p<0,05.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

3.2. Histologische Untersuchungen

3.2.1. Morphometrische Analyse der Lungengefäße - Muskularisierungsgrad

Während der 6 Wochen CIH-Exposition entwickelten die WT Mäuse eine hypoxieinduzierte pulmonale Hypertonie, erkennbar anhand der Rechtsherzhypertrophie und des erhöhten RVSP. Diese Veränderungen waren ebenfalls bei den eNOS KO Mäusen zu sehen, allerdings schon unter Normoxie. Die PH hat typischerweise einen Umbau der peripheren Lungengefäße zur Folge. Um den Grad dieses Remodelings beurteilen zu können und um zu sehen, welche Vorgänge bei den iNOS KO Mäusen vorstattengehen, wurde der Muskularisierungsgrad der pulmonalen Gefäße bestimmt.

Die Gefäße mit einem Durchmesser von 20-70 µm zeigten bei den CIH- exponierten Mäusen einen signifikant höheren Anteil an Teil- und Vollmuskularisierung (nur WT und iNOS KO Mäuse), verglichen mit den normoxischen Kontrolltieren der jeweiligen Gruppe. Außerdem waren in allen drei Mauslinien nach 6 Wochen CIH signifikant weniger nichtmuskularisierte Gefäße vorhanden als bei den Tieren, die 6 Wochen unter normoxischen Bedingungen lebten. Bei den CIH-exponierten iNOS KO Mäuse waren außerdem signifikant weniger voll- und teilmuskularisierte Gefäße sowie signifikant mehr nichtmuskularisierte Gefäße im Vergleich zu den CIH WT Mäusen zu beobachten. Die CIH eNOS KO Mäuse zeigten ebenfalls signifikant mehr nichtmuskularisierte Gefäße als die CIH WT Mäuse (Tab. 3.2.1, Abb. 3.2.1).

Gruppe (n=8)	Muskularisierungsgrad (%)		
	nicht MW ± SEM	teilweise MW ± SEM	voll MW ± SEM
Nox WT	64,5 ± 1,8	27,6 ± 2,3	7,8 ± 1,3
Nox iNOS	63,2 ± 2,4	29,1 ± 2,0	7,7 ± 1,2
Nox eNOS	56,1 ± 3,5	32,1 ± 2,7	11,9 ± 1,3
CIH WT	23,6 ± 3,7***	57,3 ± 3,9***	19,1 ± 2,4***
CIH iNOS	47,7 ± 2,8***###	39,7 ± 3,0* ###	12,6 ± 1,3#
CIH eNOS	32,4 ± 2,0 ***†	50,9 ± 1,9***	16,6 ± 1,3

Tabelle 3.2.1: Prozentualer Muskularisierungsgrad der kleinen Lungengefäße (Ø 20 - 70 µm) von allen 3 Mauslinien (n=8) ***p<0,001, *p<0,05 Nox WT vs. CIH WT, Nox iNOS vs. CIH iNOS, Nox eNOS vs. CIH eNOS, ###p<0,001 CIH WT vs. CIH iNOS, #p<0,05 CIH WT vs. CIH iNOS, †p<0,05 CIH WT vs. CIH eNOS.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

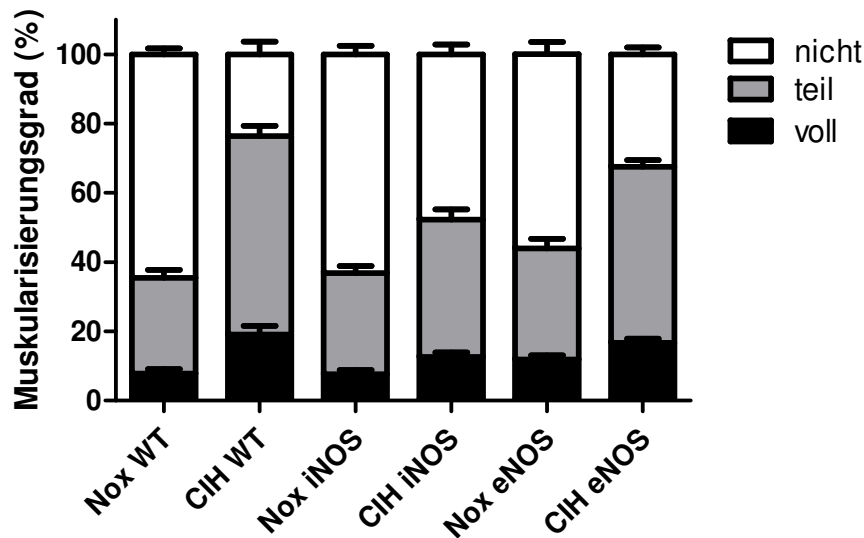


Abbildung 3.2.1: Darstellung des prozentualen Anteils nicht-, teil- und voll-muskularisierter kleiner Lungengefäße (Ø 20 – 70 µm) von allen 3 Mauslinien (n=8).
Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

3.2.2 Histologische Analyse des Herzens – Kollagengehalt

Anhand des Kollagengehaltes der Gewebefasern ist es möglich, Aussagen über den Grad der Fibrose des Herzens und somit über die Entstehung einer maladapten Hypertrophie zu machen. Im Laufe der 6 Wochen CIH-Exposition entwickelte nur die eNOS KO Mäuse, im Falle des rechten Ventrikels, einen höheren Anteil an Kollagenfasern und somit auch einen höheren Grad der Fibrose. Weiterhin zeigten sowohl die normoxischen, als auch die CIH-exponierten eNOS KO Mäuse einen signifikant höheren Kollagenanteil, als die WT bzw. iNOS KO Mäuse (Tab. 3.2.2, Abb. 3.2.2 und Abb. 3.2.3)

Gruppe (n=5-6)	Kollagengehalt (%)	
	linker Ventrikel MW \pm SEM	rechter Ventrikel MW \pm SEM
Nox WT	0,39 \pm 0,04	0,34 \pm 0,03
CIH WT	0,48 \pm 0,05	0,38 \pm 0,07
Nox iNOS	0,52 \pm 0,09	0,65 \pm 0,09
CIH iNOS	0,55 \pm 0,08	0,76 \pm 0,06
Nox eNOS	1,08 \pm 0,16**	1,04 \pm 0,14**
CIH eNOS	1,24 \pm 0,17***	1,48 \pm 0,26**

Tabelle 3.2.2: Prozentualer Kollagengehalt des linken und rechten Ventrikels von allen 3 Mauslinien (WT n=5, KO je n=6) **p<0,01, ***p<0,001 Nox WT vs. Nox eNOS und CIH eNOS. Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

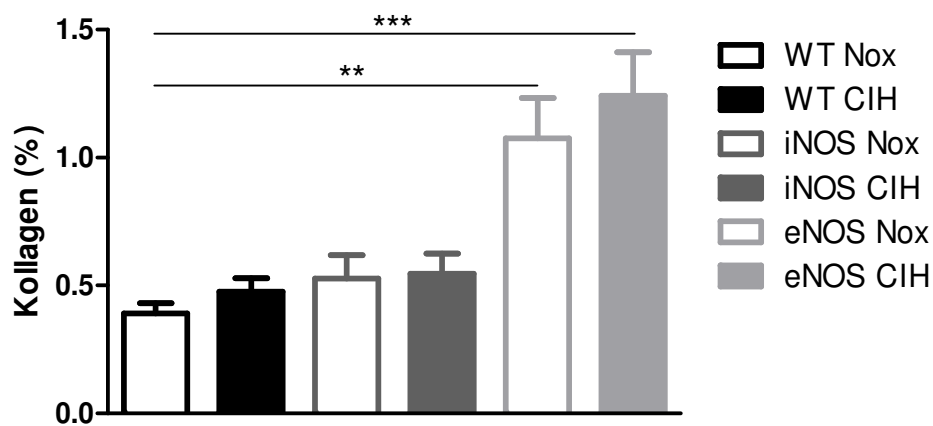


Abbildung 3.2.2: Darstellung des prozentualen Kollagengehaltes der linken Ventrikel in allen 3 Mauslinien (WT n=5, KO je n=6) ** p<0,01, ***p<0,001. Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

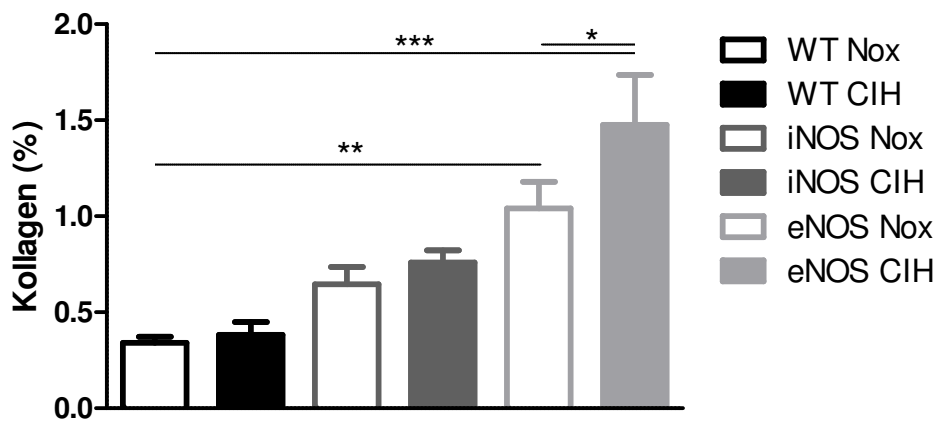


Abbildung 3.2.3: Darstellung des prozentualen Kollagengehaltes der rechten Ventrikel in allen 3 Mauslinien (WT n=5, KO je n=6) *p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001. Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

3.3 Echokardiographische Untersuchungen

Hierbei wurden mehrere Parameter erhoben, um Aussagen über die Pumpfunktion und Kontraktilität des Herzens machen zu können. Angegeben sind die Messwerte nach 6 Wochen Normoxie bzw. CIH. Eine genaue Beschreibung der Parameter ist in Kapitel 2.2.2 zu finden.

3.3.1 Cardiac output (CO) und cardiac index (CI)

Das Herzminutenvolumen (cardiac output, CO) wurde ermittelt, um Veränderungen der Pumpleistung des Herzens unter CIH zu ermitteln. Der cardiac index (CI) wurde errechnet, um Verfälschungen aufgrund des unterschiedlichen Körpergewichtes ausschließen zu können. Bei den eNOS KO Mäuse war nach 6 Wochen CIH ein signifikant geringerer CO und CI festzustellen, wohingegen bei den anderen Gruppen keine Veränderung der Herzleistung zu beobachten war (Tab. 3.3.1, Abb. 3.3.1).

Gruppe	cardiac output (ml/min)		cardiac index (ml/min/KGW)	
	MW \pm SEM	n	MW \pm SEM	n
Nox WT	23,4 \pm 2,0	7	0,91 \pm 0,06	6
CIH WT	19,5 \pm 1,1	7	0,75 \pm 0,05	7
Nox iNOS	22,5 \pm 1,9	6	0,82 \pm 0,06	6
CIH iNOS	21,2 \pm 0,8	6	0,86 \pm 0,03	6
Nox eNOS	20,3 \pm 1,9	6	0,80 \pm 0,07	6
CIH eNOS	12,3 \pm 0,8	6	0,54 \pm 0,03	6

Tabelle 3.3.1: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) und Herzindex (CI, cardiac index) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J, ml=Milliliter, min=Minute, KGW=Körpergewicht

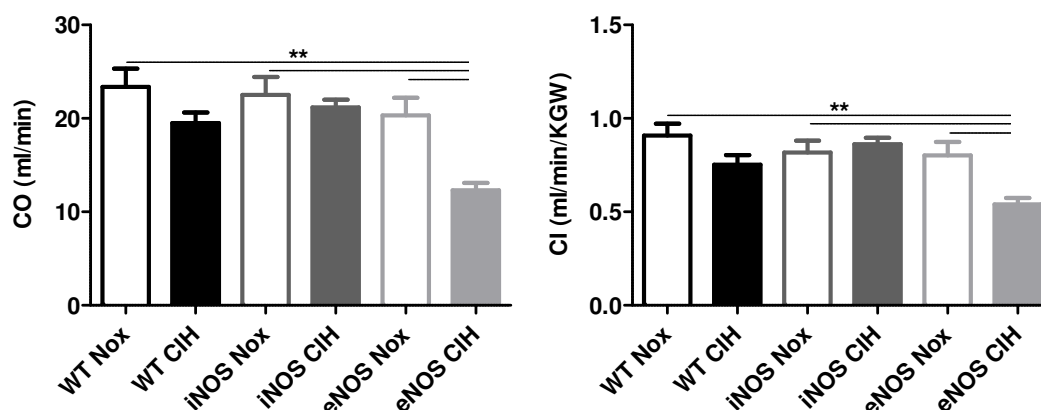


Abbildung 3.3.1: Endpunktmessung des Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) und Herzindex (CI, cardiac index) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie **p<0,01.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J, ml=Milliliter, min=Minute, KGW=Körpergewicht

3.3.2 Ejection fraction (EF) - systolische Funktion des linken Ventrikels

Die ejection fraction oder Auswurfraction ist ebenfalls ein Maß für die Pumpfunktion des Herzens und wird für den linken Ventrikel berechnet. Die eNOS KO Mäuse zeigten nach 6 Wochen CIH eine signifikant geringere linksventrikuläre Auswurfleistung, wohingegen bei den anderen Gruppen keine Veränderung der Herzfunktion zu beobachten war (Tab. 3.3.2, Abb. 3.3.2).

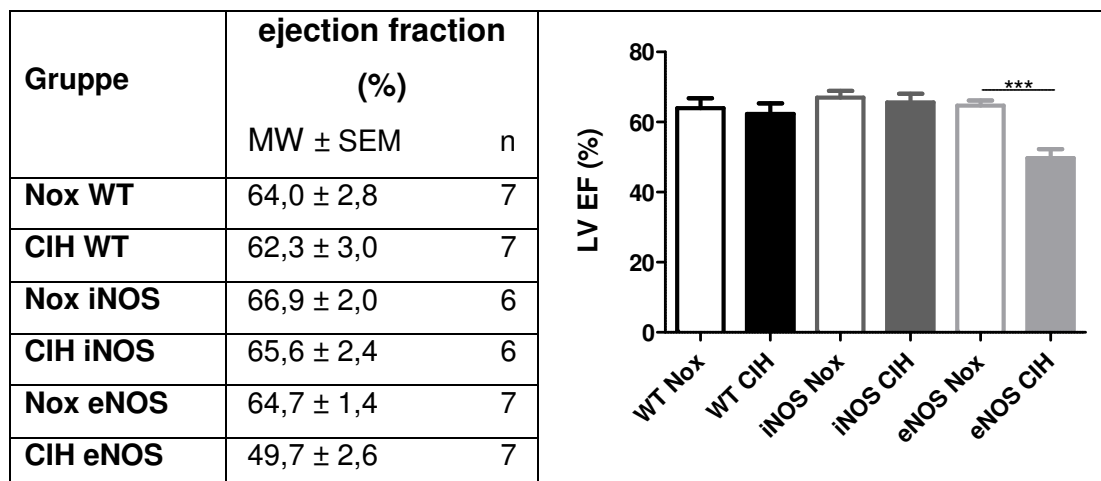


Tabelle 3.3.2: Werte der systolischen Funktion des linken Ventrikels (EF, ejection fraction) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.

Abbildung 3.3.2: Endpunktmessung der systolischen Funktion des linken Ventrikels (EF, ejection fraction) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie ***p<0,001.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J, LV=linker Ventrikel

3.3.3 LV/ RV peak systolic velocity - systolische Funktion des Herzens

Die eNOS KO Mäuse zeigten nach 6 Wochen CIH einen signifikant geringeren LV und RV peak systolic velocity-Wert, wohingegen bei den anderen Gruppen keine Veränderung der Herzfunktion zu beobachten war (Tab. 3.3.3, Abb. 3.3.3).

Gruppe	peak systolic velocity (cm/sec)			
	linker Ventrikel		rechter Ventrikel	
	MW ± SEM	n	MW ± SEM	n
Nox WT	15,1 ± 0,4	6	15,2 ± 0,6	6
CIH WT	14,9 ± 0,4	7	14,2 ± 0,5	7
Nox iNOS	14,5 ± 0,5	5	15,3 ± 0,8	5
CIH iNOS	15,6 ± 0,5	6	15,9 ± 0,4	6
Nox eNOS	14,4 ± 0,7	6	14,2 ± 0,5	6
CIH eNOS	11,5 ± 0,8	5	12,1 ± 0,4	6

Tabelle 3.3.3: Werte der peak systolic velocity des linken (LV) und rechten (RV) Herzens im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J, cm=Zentimeter, sec=Sekunde

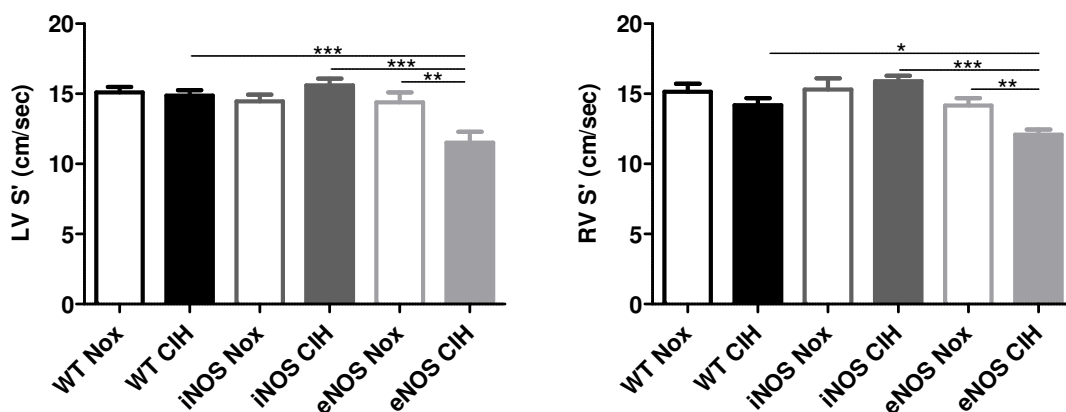


Abbildung 3.3.3: Endmessung der peak systolic velocity des linken (LV S') bzw. rechten Ventrikels (RV S') im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J, cm=Zentimeter, sec=Sekunde

3.3.4 TAPSE – systolische Funktion des rechten Ventrikels

Die TAPSE (tricuspid annular plane systolic excursion) wurde zur Analyse der systolischen Funktion des rechten Ventrikels bestimmt. Nach 6 Wochen CIH zeigten die eNOS KO Mäuse eine signifikant verminderte systolische Funktion des rechten Ventrikels, welche weder bei den WT Mäusen noch bei den iNOS KO Mäusen festzustellen war (Tab. 3.3.4, Abb. 3.3.4).

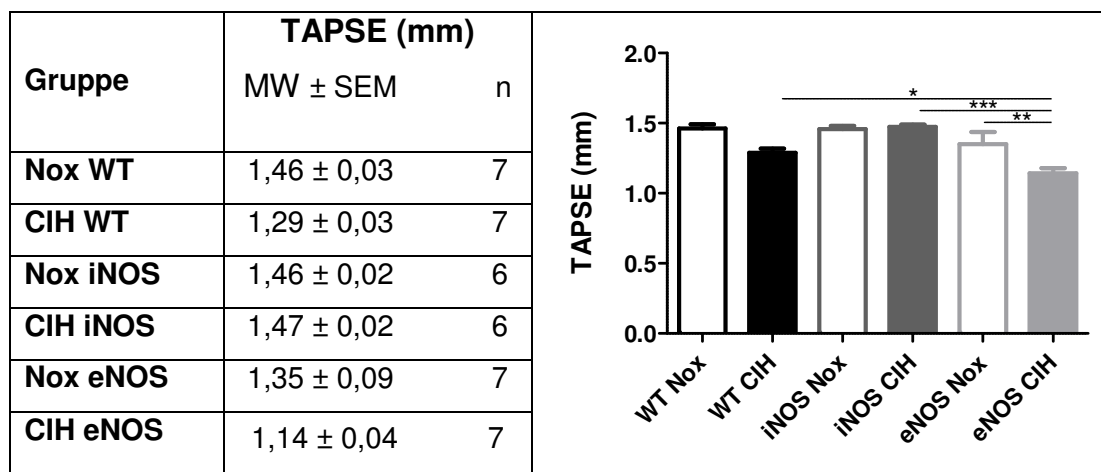


Tabelle 3.3.4: Werte der systolischen Funktion des rechten Ventrikels (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.

Abbildung 3.3.4: Endpunktmessung der systolischen Funktion des rechten Ventrikels (TAPSE) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J, mm=Millimeter

3.3.5 IVRT – diastolische Funktion des Herzens

Die IVRT (isovolumic relaxation time) dient der Analyse der diastolischen Funktion des linken und rechten Ventrikels. Nach 6 Wochen CIH war sowohl bei den WT Mäusen, als auch bei den eNOS KO Mäusen eine signifikant verminderte diastolische Herzfunktion zu beobachten, wohingegen die iNOS KO Mäuse keine Veränderung zeigten. Außerdem war schon bei den normoxischen eNOS KO Mäusen eine signifikante Herabsetzung der links- und rechtsventrikulären diastolischen Herzfunktion zu sehen, die unter CIH keine weitere Veränderung erkennen ließ (Tab. 3.3.5, Abb. 3.3.5).

Gruppe	isovolumic relaxation time (%)			
	linker Ventrikel		rechter Ventrikel	
	MW ± SEM	n	MW ± SEM	n
Nox WT	13,7 ± 1,0	5	13,9 ± 0,8	6
CIH WT	17,6 ± 1,2	7	18,0 ± 1,7	7
Nox iNOS	13,8 ± 0,6	5	13,3 ± 0,4	5
CIH iNOS	12,6 ± 0,6	6	13,4 ± 0,2	6
Nox eNOS	19,2 ± 1,2	6	17,9 ± 0,9	5
CIH eNOS	19,6 ± 0,8	5	18,1 ± 1,0	6

Tabelle 3.3.5: Werte der diastolischen links (LV)- und rechtsventrikulären (RV) Funktion (IVRT, isovolumic relaxation time) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.
Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

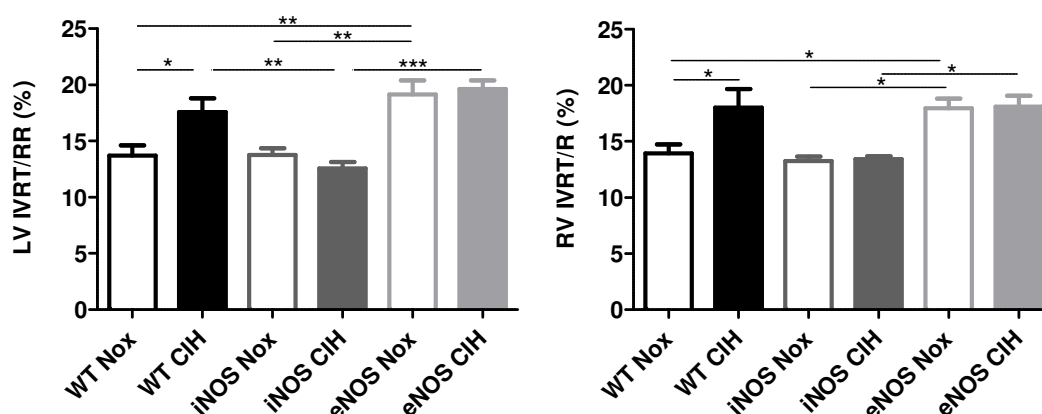


Abbildung 3.3.5: Endpunktmessung der diastolischen Funktion der linken (LV) und rechten Ventrikel (RV) (IVRT, isovolumic relaxation time) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie
*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

3.3.6 LV E'/A' peak diastolic velocities - diastolische Funktion des linken Ventrikels

Der LV E' (early) and A' (late) peak diastolic velocities ratio ist ein Parameter der dazu dient, die diastolische Funktion des linken Ventrikels (LV) zu bestimmen. Nach 6 Wochen CIH zeigten sowohl die WT Mäuse als auch die eNOS KO Mäuse eine signifikant verminderte diastolische Funktion des linken Ventrikels, wohingegen bei den iNOS KO Mäusen keine Veränderung festzustellen war. Außerdem war schon bei den normoxischen eNOS KO Mäusen eine signifikante Herabsetzung der Herzfunktion zu sehen, die sich unter CIH weiter verschlechterte (Tab. 3.3.6, Abb. 3.3.6).

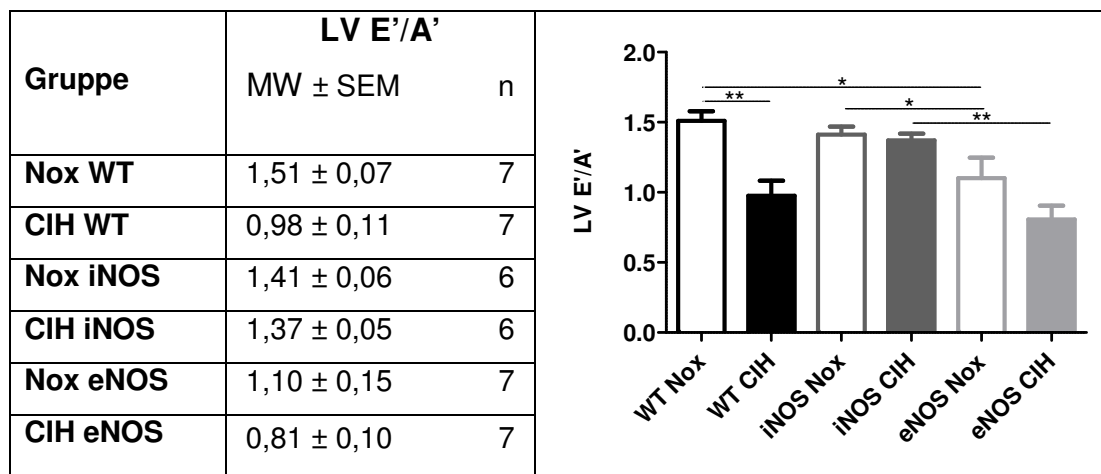


Tabelle 3.3.6: Werte der diastolischen Funktion des linken Ventrikels (LV E' (early) and A' (late) peak diastolic velocities ratio) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.

Abbildung 3.3.6: Endpunktmessung der diastolischen Funktion des linken Ventrikels (LV E' (early) and A' (late) peak diastolic velocities ratio) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie

*p<0,05, **p<0,01.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

3.3.7 MPI – globale Funktion des Herzens

Der MPI (myocardial performance index) dient der Darstellung der globalen Funktion des Herzens. Nach 6 Wochen CIH zeigten sowohl die WT Mäuse als auch die eNOS KO Mäuse eine signifikant verminderte globale Herzfunktion, wohingegen bei den iNOS KO Mäusen keine Veränderung festzustellen war. Außerdem war schon bei den normoxischen eNOS KO Mäusen eine signifikante Herabsetzung der Herzfunktion zu sehen, die sich unter CIH signifikant verschlechterte (Tab. 3.3.7, Abb. 3.3.7).

Gruppe	myocardial performance index			
	linker Ventrikel		rechter Ventrikel	
	MW \pm SEM	n	MW \pm SEM	n
Nox WT	0,75 \pm 0,04	5	0,72 \pm 0,05	6
CIH WT	0,92 \pm 0,03	7	1,01 \pm 0,07	7
Nox iNOS	0,70 \pm 0,04	5	0,67 \pm 0,04	5
CIH iNOS	0,66 \pm 0,02	6	0,79 \pm 0,02	6
Nox eNOS	0,97 \pm 0,04	6	0,90 \pm 0,05	6
CIH eNOS	1,20 \pm 0,06	5	1,10 \pm 0,07	6

Tabelle 3.3.7: Werte der linken und rechten globalen Funktion des Herzens (MPI, myocardial performance index) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

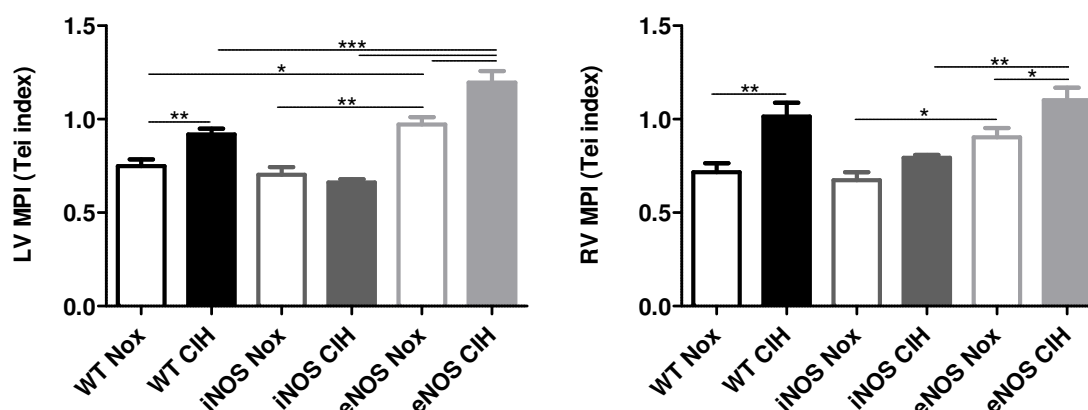


Abbildung 3.3.7: Endmessung der globalen Funktion des linken (LV) bzw. rechten Ventrikels (RV) (MPI, myocardial performance index) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

3.3.8 Zusammenfassung der echokardiographischen Befunde

Bei den WT Mäusen war die diastolische Funktion des Herzens nach 6 Wochen CIH sowohl links-, als auch rechtsventrikulär herabgesetzt. Im Falle der CIH- exponierten eNOS KO Mäuse zeigte sich eine verschlechterte systolische und diastolische Herzfunktion. Diese diastolische Funktionsminderung war auch bei den eNOS KO Mäusen zu sehen die unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden. Die Herzfunktion der iNOS KO Mäuse blieb unter CIH vollständig erhalten.

3.4. Molekularbiologische Untersuchungen

3.4.1 Genexpression von eNOS und iNOS in WT Mäusen

Zu Beginn der molekularbiologischen Untersuchungen wurde mittels RT-PCR-Analyse ein Screening der entnommenen Gewebe durchgeführt um einen Einblick in die Expression und Regulation der zu untersuchenden Gene zu bekommen. Hierbei wurden sowohl Proben von Mäusen, die einen Blutdruckkatheter implantiert hatten als auch von Tieren, die keinen solchen Katheter erhielten analysiert um Einflüsse der Implantation (vor allem bei den Gefäßen und der A. femoralis im Besonderen) auszuschließen.

3.4.1.1 Lunge

Im Lungenhomogenat der WT Mäuse zeigte sich keine Änderung der eNOS- bzw. iNOS-Genexpression unter CIH verglichen mit den normoxischen Kontrollen (Abb. 3.4.1).

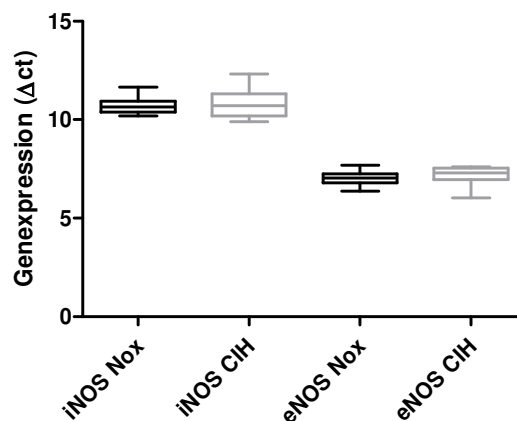


Abbildung 3.4.1: Darstellung der Genexpression von iNOS und eNOS in Lungenhomogenat von WT Mäusen im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie (Nox n=14, CIH n=11)
Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J
Boxen: Perzentil=25 und 75; Querbalken=Median; Whiskers: Perzentil=0 und 100

3.4.1.2 Herz

Im Vergleich zu den normoxischen Kontrollen war im linken Ventrikel nach sechswöchiger CIH-Exposition ebenfalls keine Regulation der Gene iNOS und eNOS zu sehen (Abb. 3.4.2 a). Der rechte Ventrikel hingegen zeigte eine signifikant niedrigere Expression, beide Gene betreffend (Abb. 3.4.2 b).

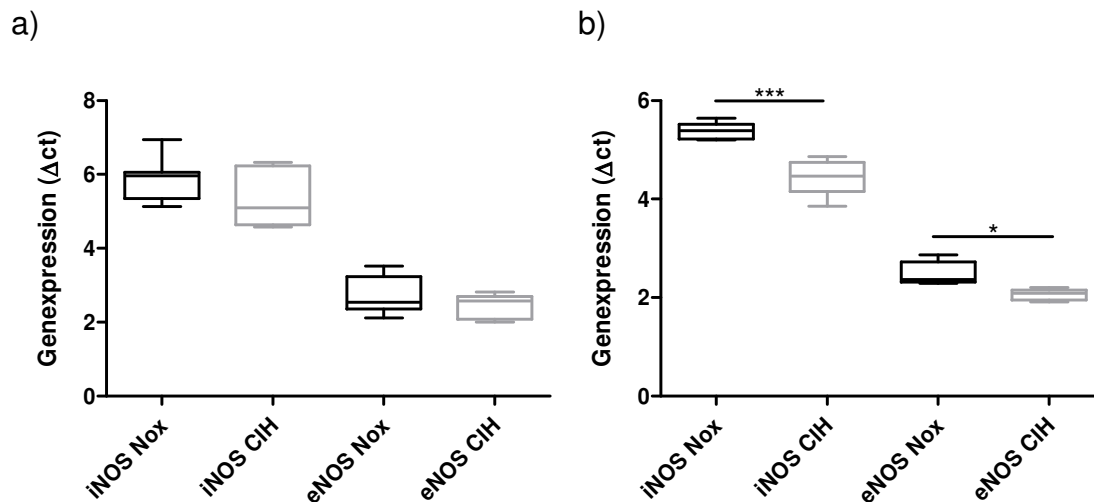


Abbildung 3.4.2: Darstellung der Genexpression von iNOS und eNOS im Homogenat des linken (a) und rechten (b) Ventrikels von WT Mäusen im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie

a) Nox n=8, CIH n=7, b) alle n=5, *p<0,05, ***p<0,001.

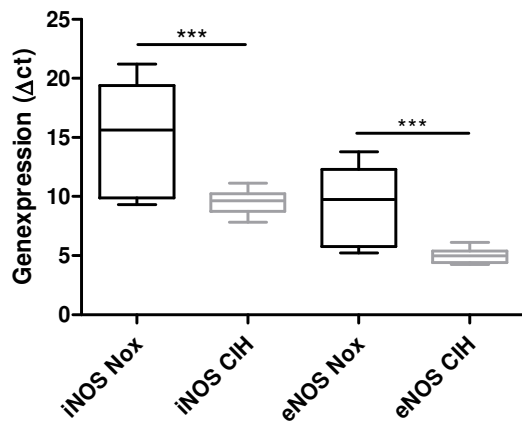
Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

Boxen: Perzentil=25 und 75; Querbalken=Median; Whiskers: Perzentil=0 und 100

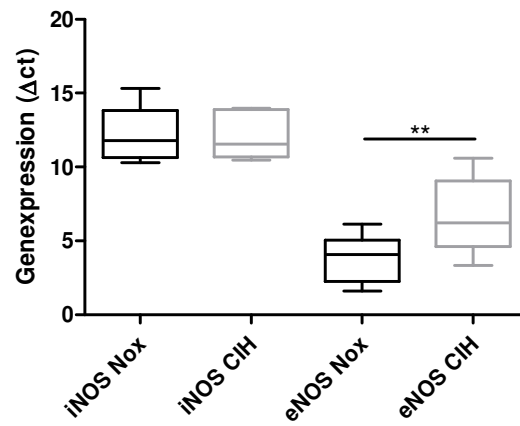
3.4.1.3 Gefäße

Weder bei der A. renalis noch bei der A. pulmonalis war eine Genregulation von iNOS oder eNOS detektierbar. Wohingegen sowohl die Aorta, als auch die A. carotis und die A. femoralis einen signifikanten Unterschied der iNOS bzw. eNOS-Expression nach sechswöchiger CIH zeigten (Abb. 3.4.3 a-e).

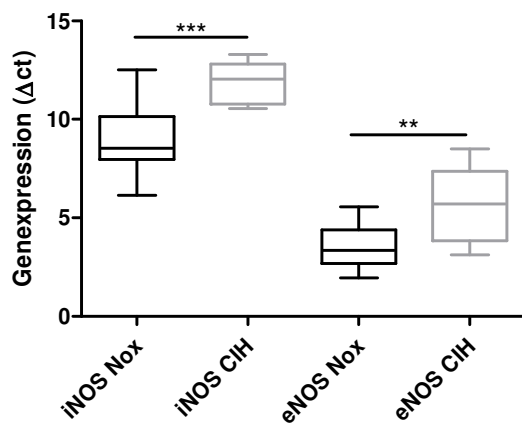
a)



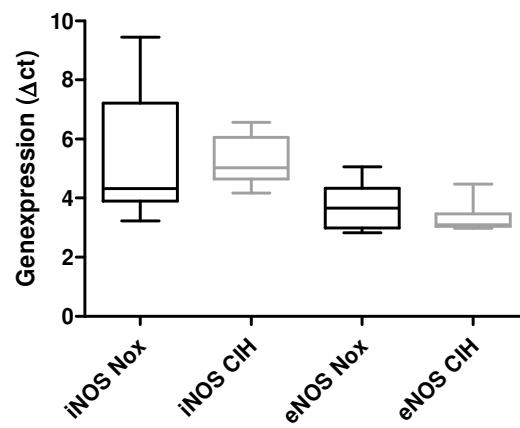
b)



c)



d)



e)

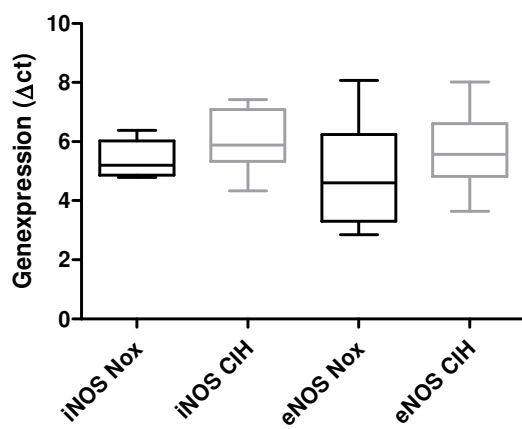


Tabelle 3.4.3: Darstellung der Genexpression von iNOS und eNOS im Gefäßhomogenat von WT Mäusen im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.

- a) Aorta *** $p < 0,001$ Herunterregulation der Genexpression von iNOS (jeweils $n=13-14$),
- b) A. carotis ** $p < 0,01$ Hochregulation der Genexpression von eNOS (Nox $n=8-9$, CIH $n=6-11$),
- c) A. femoralis ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ Hochregulation der Genexpression von iNOS und eNOS (Nox $n=10$, CIH $n=6-11$),
- d) A. pulmonalis (Nox $n=9$, CIH $n=6-9$),
- e) A. renalis (Nox $n=9-10$, CIH $n=10-11$).

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

Boxen: Perzentil=25 und 75; Querbalken=Median; Whiskers: Perzentil=0 und 100

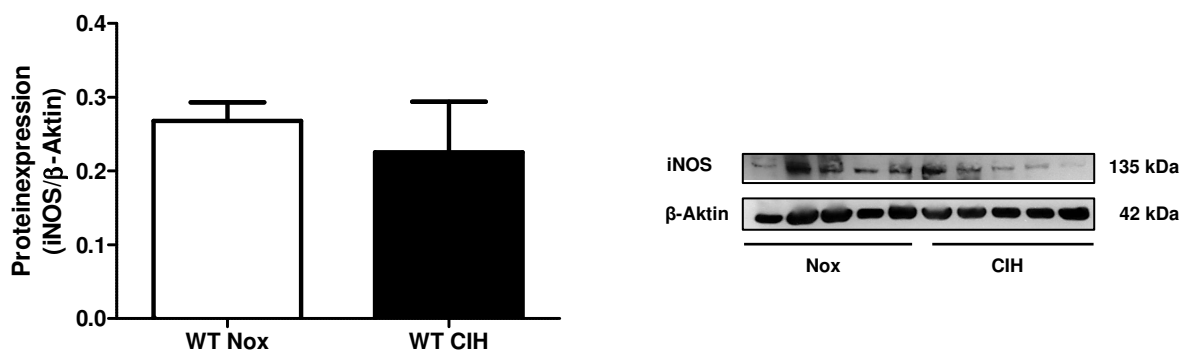
3.4.2 Proteinexpression von eNOS und iNOS in WT Mäusen

Die Proteinexpression von eNOS und iNOS im Gewebehomogenat der WT Mäuse wurde mittels Westernblot-Verfahren bestimmt. Die Proteinmenge des Lungenhomogenates wurde zu β -Aktin und die des linken bzw. rechten Ventrikelhomogenats zu α -Tubulin normalisiert.

3.4.2.1 Lunge

Im Lungenhomogenat der WT Mäuse war weder für iNOS (a) noch für eNOS (b) eine Änderung der Proteinexpression unter CIH zu erkennen (Abb. 3.4.4).

a)



b)

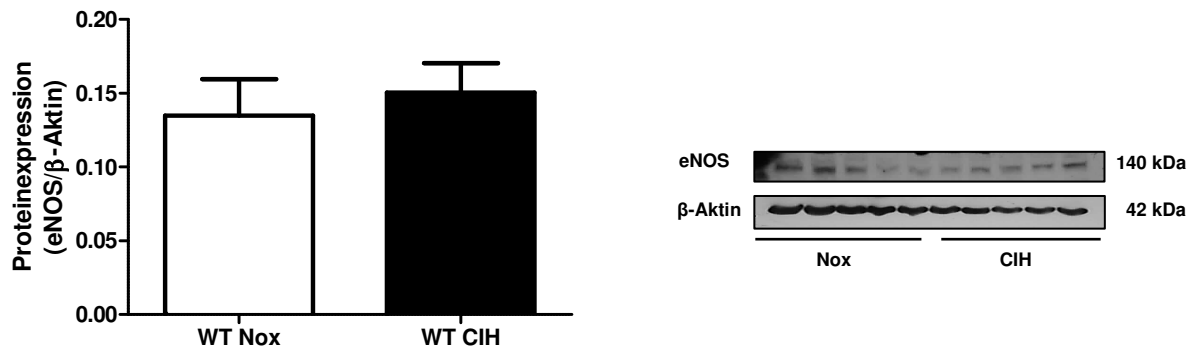
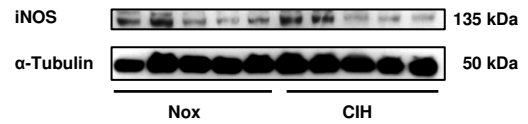
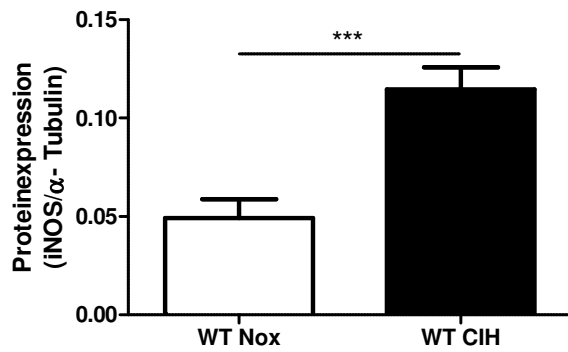


Abbildung 3.4.4: Darstellung der Proteinexpression von eNOS und iNOS im Lungenhomogenat der WT Mäuse im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie. a) und b) alle n=5
Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

3.4.2.2 Herz

Die Expression von eNOS und iNOS im Herzen war bei den WT Mäusen, die sechs Wochen unter CIH gehalten wurden signifikant erhöht. Dies galt sowohl für den linken (eNOS und iNOS) als auch für den rechten (iNOS) Ventrikel (Abb. 3.4.5 und 3.4.6).

a)



b)

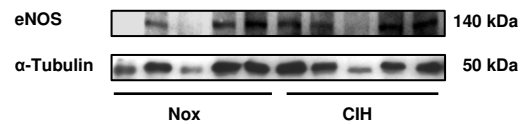
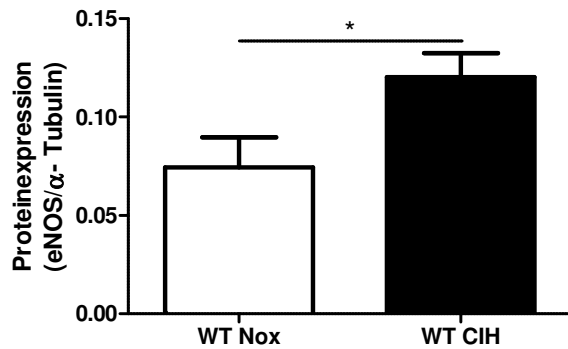
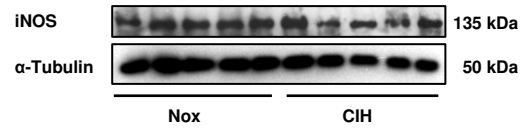
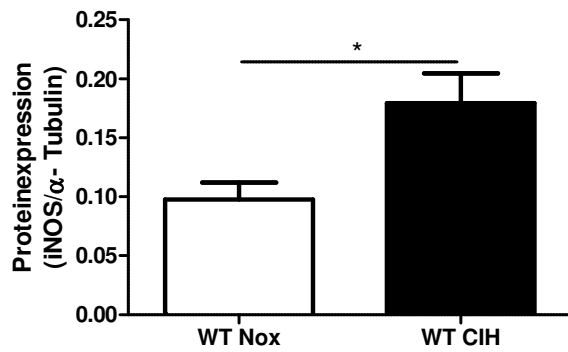


Abbildung 3.4.5: Darstellung der Proteinexpression von eNOS und iNOS im Homogenat des linken Ventrikels der WT Mäuse im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.

a) WT n=8, CIH n=10, ***p<0,001 WT Nox vs. WT CIH. Hochregulation der iNOS-Proteinexpression.

b) WT n=8, CIH n=9, *p<0,05 WT Nox vs. WT CIH. Hochregulation der eNOS-Proteinexpression
Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

a)



b)

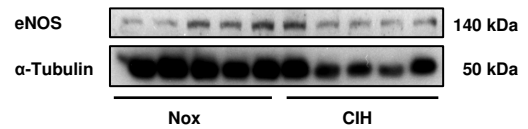
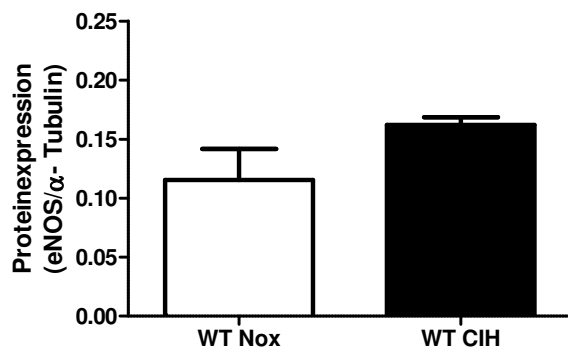


Abbildung 3.4.6: Darstellung der Proteinexpression von eNOS und iNOS im Homogenat des rechten Ventrikels der WT Mäuse im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.

a) n=5 *p<0,05 WT Nox vs. WT CIH. Hochregulation der iNOS-Proteinexpression.

b) n=5

Nox=Normoxie, CIH=chronisch intermittierende Hypoxie, WT=C57BL/6J

4. Diskussion

4.1 Wahl des Tiermodells

Das OSAS stellt eine ernsthafte Erkrankung des Menschen dar, die mit schwerwiegenden Veränderungen des Herzkreislaufsystems, darunter der Entwicklung einer arteriellen und pulmonalen Hypertonie einhergeht. Die Pathogenese des systemischen Blutdruckanstiegs ist von einem komplexen Zusammenspiel unterschiedlicher Faktoren und deren Einfluss auf vielfältige Körperfunktionen abhängig. Deshalb ist eine Erforschung dieser Zusammenhänge anhand von Zellkulturversuchen nicht möglich, sondern muss am Ganztier geschehen. Hierbei bietet sich die Maus als Versuchstier an, da zum einen das Genom dieser Tierart vollständig sequenziert und damit bekannt ist und zum anderen eine Vielzahl von genetisch veränderten Varianten für die Maus zur Verfügung stehen.

4.1.1 Chronische intermittierende Hypoxie

In dieser Arbeit wurde zur Nachstellung des OSAS und dessen Folgeerkrankungen das Mausmodell der chronisch intermittierenden Hypoxie verwendet, wobei Mäuse tagsüber 8 Stunden exponiert und nachts unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden. Dabei muss beachtet werden, dass Mäuse nocturnale Tiere sind und somit die Exposition in ihrer Nachtphase, jedoch Schlaf-unabhängig durchgeführt wurde.

Wie bereits in 1.5.1 beschrieben stehen mehrere unterschiedliche Tiermodelle zur Untersuchung des OSAS zur Verfügung, wobei die CIH das am häufigsten verwendete Modell ist (**Jun** 2007; **Jun** 2009; **Drager** 2010).

Ein Vorteil dieses Modells ist, dass es nichtinvasiv ist (**Jun** 2007), dass eine große Anzahl an Tieren exponiert werden kann (**Drager** 2010) und dass der technische Aufwand gering bleibt (**Lee** 2009). Zudem konnte schon anhand mehrerer Studien gezeigt werden, dass das Modell der CIH die pathophysiologischen Vorgänge des OSAS, darunter arterielle Hypertonie (**Fletcher** 1992), Herzfunktionsstörungen (**Chen** 2005), Insulinresistenz (**Iiyori** 2007), Hyperlipidämie (**Li** 2005) und Arteriosklerose (**Savransky** 2007) zuverlässig abbildet (**Lee** 2009).

Die Limitation dieses Modells besteht darin, dass es keine Obstruktion der oberen Atemwege herbeiführt. Daher können weder die damit einhergehende Hyperkapnie noch die intrathorakalen Druckschwankungen und deren Einflüsse auf das Herzkreislaufsystem erforscht werden. Weiterhin zeigen die Tiere, bei Schlaf-unabhängiger Exposition weder eine Schlaffragmentation noch Arousals, welche zwei wichtige Faktoren bei der Entstehung des OSAS und dessen Begleiterscheinungen darstellen (**Lee** 2009). Das Modell der Schlaffragmentation bei Tieren, welches Arousals erzeugt, ist jedoch ebenfalls dahingehen limitiert, dass die Arousals nicht sicher über einen längeren Zeitraum reproduzierbar sind. Dadurch stellt sich die Frage, ob der Reiz, welcher zur Weckreaktion führt, auch über eine lange Zeitspanne effektiv ist (**Jun** 2007).

Einen weiteren limitierenden Faktor stellt die Tatsache dar, dass viele Arbeitsgruppen unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen unter Hypoxie und unterschiedlich lange Normoxie- bzw. Hypoxiephasen anwenden, was eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Studien erschwert (**Lee** 2009).

Für die vorliegende Arbeit wurde ein Zyklus von 60 sec Normoxie und 60 sec Hypoxie über 8 Stunden sowie eine Sauerstoffkonzentration von 6-7% gewählt. Beide Parameter liegen in einem mittleren Bereich der Werte, die laut Literatur in anderen Arbeitsgruppen verwendet wurden. Diese liegen bei 30-120 sec Hypoxie/Normoxie und einer Sauerstoffkonzentration von 3-10% (**Jun** 2007; **Drager** 2010). Entscheidend für die Wahl dieser Werte war die Sauerstoffsättigung bzw. die Entsättigung des Blutes der Mäuse unter Hypoxie. Patienten, die unter OSAS leiden zeigen eine nächtliche Sauerstoffsättigung von einem Minimalwert von 66% (**Bradley** 1985), $69 \pm 12\%$ (**Mediano** 2007), bzw. 75% (**Louis** 2009). In der vorliegenden Studie nahm der Minimalwert der Sauerstoffsättigung unter Hypoxie bei allen 3 Mauslinien einen Wert an, der mit 53-57% etwa im Bereich dieser Sauerstoffsättigungswerte bei humanen Patienten mit OSAS liegt. Es muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass die Tiere unter Narkose (Ketamin/Xylazin) gemessen wurden und dass die Sättigungswerte speziesabhängig unterschiedlich ausfallen können. So war der normoxische Wert mit 93-94% etwas unter dem Wert des Menschen mit 98% (**Louis** 2009). Der CIH Zyklus mit jeweils 60 sec Normoxie und Hypoxie stellt 30 Entsättigungen pro Stunde nach und generiert somit eine (mittel-) schwere Form des OSAS (entsprechend einem ODI=30, s.

Kapitel 1.1.1). Eine Dauer der Exposition von 8 Stunden am Tag wurde gewählt, da diese Zeit der durchschnittlichen Schlafdauer eines erwachsenen Menschen entspricht (**Borbély** 1998, Ausgabe für das Internet). Bisher wurde dieses Tiermodell vor allem bei Ratten erfolgreich verwendet (**Fletcher** 1992). Mäuse sind in letzter Zeit in den Fokus der Forschung gerückt, da sie, aufgrund des vollständig entschlüsselten Genoms, den Vorteil der Verwendung von knockout- oder gegenüberexprimierenden-Tieren haben und somit die Erforschung der pathophysiologischen Vorgänge ermöglichen (**Tagaito** 2001; **Eisele** 2006). Somit existierte vor der Etablierung eines Mausmodells zur Nachstellung der Schlafapnoe kein Modell, das die Untersuchung der molekularen Grundlagen anhand von Genknockout oder Genüberexpression erlaubte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Tiermodell der CIH das am besten beschriebene Modell für das OSAS ist, und geeignet, die pathophysiologischen Mechanismen des OSAS nachzustellen und zu erforschen (**Jun** 2007; **Lee** 2009). Allerdings können anhand des CIH-Modells nicht alle Symptome des OSAS (Obstruktion, Arousal) generiert werden und somit ist bei diesem murinen Modell wie auch bei jedem anderen Tiermodell eine Übertragung auf den Menschen limitiert.

4.2. Physiologische Effekte der CIH auf die WT, iNOS KO und eNOS KO Mäuse

4.2.1 Auswirkungen der CIH auf die Gewichtsentwicklung

Alle Mäuse zeigten nach sechswöchiger CIH-Exposition eine geringere Gewichtszunahme (WT) bzw. eine Gewichtsabnahme (KO) verglichen mit den jeweiligen normoxischen Kontrolltieren. Außerdem war die Gewichtszunahme bei den WT Mäusen höher als bei den KO Tieren. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das Durchschnittsgewicht der WT Tiere zu Beginn des Experiments etwas unter dem Durchschnittsgewicht der KO Mäuse lag. Nichtsdestotrotz ist die Differenz zwischen dem Gewicht der normoxischen und dem Gewicht der CIH-exponierten Tiere am Ende des Versuches mit ca. 11% gleich.

Eine mögliche Ursache dafür, dass die Tiere unter CIH eine geringere Gewichtszunahme oder eine Gewichtsabnahme zeigen, kann in der Belastung liegen, die die Hypoxie bei diesen Tieren hervorruft und die in einer verminderten

Wasser- und Futteraufnahme gipfelt. Dieses Phänomen war auch schon in anderen Studien bei Mäusen (**Jun** 2008) oder Ratten (**Singh** 1993), welche intermittierender Hypoxie ausgesetzt waren zu beobachten. Dies bestätigte auch eine weitere Studie von Li et al., bei der CIH ebenfalls mit einer Gewichtsabnahme aufgrund einer geringeren Futteraufnahme bei Mäusen einherging (**Li** 2007). Ähnliche Erscheinungen können auch beim Menschen beobachtet werden, was zu der Annahme führte, dass Hypoxie zur Unterdrückung des Hungers und zu einem Fettverlust führt und somit einen neuen Ansatz in der Therapie der Adipositas beim Menschen darstellen könnte (**Quintero** 2010; **Urdampilleta** 2012).

4.2.2 Auswirkungen der CIH auf den Hämatokrit

Nach 6 Wochen war bei allen CIH-exponierten Mäusen ein signifikanter Anstieg des Hämatokrits zu beobachten. Hierbei handelt es sich um einen physiologischen Adaptationsmechanismus, bei dem zum einen mittels einer Diurese das Plasmavolumen verringert wird. Zum anderen kommt es zu einer Steigerung der Erythropoese was eine Erhöhung der Hämoglobinkonzentration zur Folge hat. Dadurch wird die Sauerstofftransportkapazität erhöht um den durch die Hypoxie verursachten Sauerstoffmangel zu antagonisieren (**Woods** 2011).

4.2.3 Auswirkungen der CIH auf die Entwicklung einer arteriellen und pulmonalen Hypertonie sowie einer Herzhypertrophie

Für das OSAS des Menschen ist bekannt, dass es mit einer arteriellen Hypertonie und daraus resultierendem Linksherzversagen einhergeht. Seit einiger Zeit ist auch bekannt, dass diese Erkrankung nicht nur zu Veränderungen am linken Herzen, sondern auch zu Rechtsherzhypertrophie führen kann (**Berman** 1991; **Noda** 1995; **Kober** 1996).

Bei den Mäusen der vorliegenden Studie war die Ratio des linken Ventrikels zum Körpergewicht als Maß für die Linksherzhypertrophie bzw. das Verhältnis des Herzgewichtes zum Körpergewicht nur bei den eNOS KO Mäusen signifikant verändert. So war für beide Ratios sowohl bei den normoxischen als auch bei den CIH-exponierten eNOS KO Mäusen ein signifikant höherer Wert, als bei den WT und iNOS KO Mäusen zu sehen, die im Vergleich mit ihren Kontrollen keinerlei Veränderung der Ratios unter CIH zeigten. Eine Rechtsherzhypertrophie, gemessen anhand der Ratio von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum war nach

sechswöchiger CIH nur bei den WT Mäusen festzustellen. Weder die iNOS KO Mäuse noch die eNOS KO Mäuse zeigten einen solchen Anstieg der Ratio unter den Bedingungen der CIH. Eine Bestimmung der Ratio von rechtem Ventrikel zu Körpergewicht führte zu davon abweichenden Ergebnissen die Rechtsherzhypertrophie der eNOS KO Tiere betreffend. Hier zeigten diese Mäuse sowohl unter Normoxie als auch unter CIH eine signifikante Erhöhung der Ratio, verglichen mit den WT Mäusen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass diese Tiere ein vergrößertes linkes Herz haben, wodurch die Aussagekraft der Ratio von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum in Bezug auf die Rechtsherzhypertrophie an Wert verliert. Im Unterschied dazu war bei den iNOS KO Mäusen keine Hypertrophie des rechten oder linken Ventrikels zu erkennen. Dies bedeutet, dass diese Tiere auf den Reiz der CIH nicht mit einer Hypertrophie des Herzens reagieren. Das lässt wiederum darauf schließen, dass eine Deletion von iNOS einen positiven Effekt auf das kardiale Remodeling hat.

Diese Ergebnisse wurden auch durch die terminale Messung des RVSP der Mäuse bestätigt. Hier zeigten die CIH-exponierten WT Mäuse im Gegensatz zu der normoxischen Gruppe einen signifikanten Anstieg des RVSP. Bei den eNOS KO Mäusen war, verglichen mit den normoxischen WT Mäusen bereits unter Normoxie eine signifikante Erhöhung des RVSPs zu sehen, der unter CIH allerdings nicht weiter Anstieg, sondern einen geringen, nichtsignifikanten Abfall zeigte. Interessanterweise zeigten die normoxischen iNOS KO Mäuse einen erhöhten RVSP, der nach sechswöchiger CIH-Exposition signifikant auf das Niveau der normoxischen WT Mäuse abfiel. Dieser erhöhte normoxische RVSP konnte auch schon tendenziell in einer anderen Studie bei einem Mausmodell der zigarettenrauchinduzierten COPD beobachtet werden (**Seimetz** 2011). Eine Erklärung für dieses Phänomen ist anhand der gewonnenen Daten jedoch nicht möglich und bedarf weiterer Forschung.

Der Druckanstieg im rechten Ventrikel und die daraus resultierende Rechtsherzhypertrophie, welche die WT und eNOS KO Mäuse zeigten ist eine häufig beobachtete Erscheinung im Tiermodell der CIH. So konnte dieser Mechanismus schon in anderen Studien bei Mäusen (**Fagan** 2001a; **Fagan** 2001b; **Campen** 2005) und Ratten (**McGuire** 2001) beobachtet werden. Dieser Effekt kann dadurch erklärt werden, dass es aufgrund der CIH zu einer hypoxiebedingten pulmonalen

Vasokonstriktion und zum vaskulären Remodeling kommt (**Campen** 2005). Dies führt zu einer Steigerung der rechtsventrikulären Nachlast, welche durch eine Erhöhung der pulmonalen Resistance bei gleichzeitig erniedrigter Compliance hervorgerufen wird. Die Reaktion des rechten Ventrikels auf diese Vorgänge besteht aus einer kompensatorischen Hypertrophie, welche bei Fortbestehen des Stimulus in einer terminalen Rechtsherzdekompensation gipfeln kann (**Stenmark** 2006b; **Schermuly** 2011).

Die Hypertonie der CIH-exponierten WT Mäuse in dieser Studie war nicht mit einer Hypertrophie des linken Herzens verknüpft. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch eine Studie von Fagan an Mäusen (**Fagan** 2001a), wohingegen bei Studien mit Ratten oft, aber nicht immer, eine Linksherzhypertrophie als Begleiterscheinung der Hypertonie bei CIH auftrat. Dies führte zu der Hypothese, dass der Stimulus, welcher zur Linksherzhypertrophie führt, nicht die erhöhte Nachlast, sondern die intermittierende Hypoxie selbst ist (**McGuire** 2001; **Campen** 2005). Darüber hinaus kann die Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie beim OSAS des Menschen durch die dabei auftretenden intrathorakalen Druckschwankungen begünstigt werden (**Damy** 2011). Dieser Mechanismus ist beim Mausmodell der CIH nicht gegeben, da keine Obstruktion der Atemwege vorliegt. Weiterhin ist es möglich, dass die Abweichung in der Reaktion auf den Stimulus der CIH infolge von Spezies- oder sogar Stammunterschieden hervorgerufen wird, weshalb hier noch forschungsbedarf besteht (**Fagan** 2001a). Für stammspezifische Unterschiede sprechen auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie für die eNOS KO Mäuse, die zusätzlich zu einer Rechtsherzhypertrophie bereits unter Normoxie eine linksventrikuläre Hypertrophie entwickeln. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Tiere diese kardiale Veränderung infolge des knockouts entfalten. Dafür sprechen zum Beispiel die Ergebnisse einer Studie von Shibata et al., die bei eNOS KO Mäusen eine spontane Linksherzhypertrophie mit assoziierter diastolischer Dysfunktion des Herzens und Hypertonie beobachtet haben (**Shibata** 2010).

Ab einem Zeitraum von 2-3 Wochen CIH-Exposition zeigten die WT Mäuse, verglichen mit ihren Kontrollen einen Anstieg des systolischen und mittleren arteriellen Blutdrucks vom Anfangswert. Der diastolische Blutdruck war bereits am 1. Tag des Versuches erhöht und stieg im Laufe des Experiments kontinuierlich weiter an. Interessanterweise zeigten sowohl die normoxischen als auch die CIH-

exponierten eNOS KO Mäuse zu Beginn der Studie einen signifikant höheren Blutdruck (siehe Kapitel 3.1.10.4) als die anderen beiden Mauslinien, der trotz des Blutdruckabfalls (vor allem des systolischen Blutdruckes) dieser Mäuse bis zum Ende der Studie erhalten blieb. Dieser Hypertonus der eNOS KO Mäuse ist auch schon bei anderen Studien beobachtet worden und ist ein Effekt, der infolge des knockouts der endothelialen NO-Synthase auftritt und anhand des Fehlens des von eNOS gebildeten NO erklärt werden kann (**Van Vliet** 2003; **Balligand** 2009; **Shibata** 2010). Erstaunlicherweise zeigten die eNOS KO Mäuse, der Hypothese dieser Arbeit entgegen, zum Versuchsende keinen höheren Blutdruck als die Tiere ihrer Kontrollgruppe. Stattdessen war ein Blutdruckabfall, besonders des systolischen Blutdruckes zu erkennen. Allerdings ging dem Blutdruckabfall der CIH-exponierten eNOS KO Mäuse ein leichter Anstieg des Blutdruckes (insbesondere des diastolischen Blutdruckes) voraus. Um dieses Phänomen erklären zu können muss der Regelkreis des Blutdruckes genauer betrachtet werden. Ein erhöhter Blutdruck bewirkt eine Erhöhung der Nachlast, mit Auswirkungen auf das Schlagvolumen, welche eine Senkung des CO zur Folge hat, welche wiederum den Blutdrucks verringert (**Schneider** 2008).

Die Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchungen der eNOS KO Mäuse zeigen eine enorme (um ca. 40% reduzierte) Beeinträchtigung des CO unter den Bedingungen der sechswöchigen CIH, welche unter Normoxie nicht feststellbar ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Tiere nach ca. 2-3 Wochen CIH-Exposition keinen weiteren Blutdruckanstieg zeigen, weil der CO auffallend stark reduziert ist und somit zu einer Hypotonie anstatt einer Hypertonie führt. Leider wurden zu diesem Zeitpunkt keine echokardiographischen Untersuchungen durchgeführt, wodurch diese Annahme nicht anhand von Daten bestätigt werden kann. Die Tatsache, dass die normoxischen eNOS KO Mäuse genauso wie die normoxischen WT und iNOS KO Mäuse bei normalem CO ebenfalls einen systolischen Blutdruckabfall zeigen, ist jedoch anhand des Regelkreises nicht erklärbar und bedarf weiterer Forschung. Da dieses Phänomen bei allen drei Mauslinien auftritt handelt es sich womöglich um eine adaptive Reaktion auf das Handling und Messen dieser Mäuse.

Abgesehen davon zeigten die iNOS KO Mäuse im Gegensatz zu den WT und eNOS KO Mäusen keine signifikante Veränderung des Blutdruckes während der

sechswöchigen CIH. Weiterhin war zu den Kontrolltieren kein Unterschied in der sechswöchigen Blutdruckentwicklung zu sehen. Dies spricht für eine protektive Wirkung der Deletion der iNOS auf die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie unter den Bedingungen der CIH. Allerdings hatten die CIH-exponierten iNOS KO Mäuse verglichen mit den normoxischen Mäusen dieser Linie in der ersten Woche einen signifikant höheren systolischen, diastolischen und mittelarteriellen Blutdruckmittelwert. Dieser ist aber mit 5 mmHg nur gering erhöht und somit handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit nur um einen Zufallsbefund, der aufgrund des individuellen Blutdruckes jeder Maus zustande kam.

4.3 Histologisch untersuchte Effekte der CIH auf die WT, iNOS KO und eNOS KO Mäuse

4.3.1 Auswirkungen der CIH auf den Muskularisierungsgrad der kleinen pulmonalen Gefäße

Eine PH, welche im Rahmen eines OSAS auftreten kann, geht mit einer verstärkten Muskularisierung der kleinen Gefäße (\varnothing 20-70 μ m) einher. Um die Auswirkungen der CIH auf das Gefäßremodeling und somit auf die Ausbildung einer PH im Mausmodell zu untersuchen, wurden die glatten Muskelzellen mit Anti- α -Aktin Antikörper angefärbt und anschließend der Muskularisierungsgrad als Anteil der α -Aktin positiven Gefäßwandareale quantitativ ausgewertet. Dies stellt eine etablierte Methode zur Detektion des Muskularisierungsgrades der pulmonalen Gefäße dar (**Revermann** 2009; **Dahal** 2011; **Kosanovic** 2011). In der vorliegenden Arbeit zeigten alle drei Mäusegruppen unter CIH eine signifikante Erhöhung des Muskularisierungsgrades der kleinen, pulmonalen Gefäße verglichen mit ihrer jeweiligen Kontrollgruppe. Dieser Anstieg des Muskularisierungsgrades sowie die Rechtsherzhypertrophie bei den WT Mäusen und den eNOS KO Mäusen als auch der erhöhte RVSP, sprechen für die Entwicklung einer PH bei diesen Tieren unter den Bedingungen der CIH. Dies konnte auch bereits im Rahmen anderer Studien an Mäusen gezeigt werden (**Fagan** 2001a; **Nisbet** 2009). Interessanterweise zeigten die eNOS KO Mäuse keine stärkere Muskularisierung der kleinen Lungengefäße als die WT Mäuse, sondern sogar einen höheren Anteil an nichtmuskularisierten Gefäßen. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von der bei Steudel et al. gefundenen

Entwicklung unter chronischer Hypoxie. Hier war bei den eNOS KO Mäusen nach drei Wochen Hypoxie ein größerer Anteil an muskularisierten und ein geringerer Prozentsatz an nichtmuskularisierten Gefäßen verglichen mit den WT Mäusen (SV129) erkennbar (**Steudel** 1998). Diese Unterschiede könnten aufgrund der unterschiedlichen Hypoxiebedingungen (3 Wochen Hypoxie vs. 6 Wochen CIH) sowie durch Stammunterschiede der Mäuse (SV129 vs. C57BL6/J) aufgetreten sein. Obwohl die iNOS KO Mäuse keinerlei Entwicklung in Richtung einer links- und/oder rechtsventrikulären Hypertrophie des Herzens aufwiesen, war bei diesen Mäusen ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Muskularisierung der kleinen Lungengefäße zu erkennen, welcher allerdings weit (ca. 30%) unter dem der WT Mäuse lag. Wie bereits unter 1.3.2 beschrieben sind die Folgen des Remodelings eine Verringerung der Compliance sowie eine Erhöhung der rechtsventrikulären Nachlast mit daraus resultierender massiver Belastung des rechten Ventrikels (**Schermuly** 2011). Die Ergebnisse der iNOS KO Mäuse sprechen also dafür, dass das Fehlen der iNOS zu einem verringerten hypoxieinduzierten Remodeling führt, was protektive Einflüsse auf die Entstehung einer Rechtsherzhypertrophie infolge einer erhöhten Nachlast hat.

4.3.2 Auswirkungen der CIH auf den Kollagengehalt der Herzfasern

Um einer erhöhten Nachlast aufgrund einer Hypertonie entgegenzuwirken, stehen dem Herzen eine Reihe von Adaptationsmechanismen zur Verfügung. Auf eine gesteigerten Nachlast initiiert das Herz einige Kompensationsmechanismen, darunter die Aktivierung des Sympathikus und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Als längerfristiger Kompensationsmechanismus kann eine konzentrische Hypertrophie, die als Folge einer Zunahme der Wandstärke entsteht, auftreten. Die Aktivierung des RAAS und des Sympathikus führt zu einer Vasokonstriktion mit nachfolgender Blutdruckerhöhung, ebenso wie zu einer Steigerung der Herzfrequenz und -kontraktilität. Bleibt die Ursache für die Belastung des Herzens längerfristig bestehen, so vermag dieses der Belastung nicht mehr standzuhalten, was in einer pathologischen Hypertrophie resultiert. Diese ist gekennzeichnet durch ein ventrikuläres Remodeling, welches Apoptose, Nekrose, Fibrose und schließlich eine kardiale Dysfunktion zur Folge hat (**Schneider** 2008; **Bernardo** 2010). Ein Kriterium, um den Übertritt der adaptiven (physiologischen) zur maladaptiven (pathologischen)

Hypertrophie des Herzens zu charakterisieren ist die Bestimmung des Fibrosegrades, da die maladaptive Hypertrophie zu einem Verlust an Kardiomyozyten und deren Austausch durch fibrotisches Material führt (**Bernardo** 2010).

Um den Fibrosegrad der Herzen bestimmen zu können wurden die kollagenen Fasern der histologischen Schnitte mit Hilfe von "sirius red" rot gefärbt und anschließend prozentual ausgewertet. Diese Methode zur Messung des Fibrosegrades des Herzens wurde schon in anderen Studien beschrieben (**Kosanovic** 2011; **Ramirez** 2012). In der hier vorgestellten Arbeit zeigten weder die WT noch die iNOS KO Mäuse nach sechswöchiger CIH-Exposition eine Veränderung des Kollagengehaltes des linken oder des rechten Ventrikels. Gemessen an den normoxischen WT Mäusen war dagegen bei den eNOS KO Mäusen schon unter Normoxie eine Erhöhung des Kollagengehaltes zu beobachten, der unter CIH noch weiter anstieg. Für den rechten Ventrikel war nach sechs Wochen CIH sogar eine signifikante Erhöhung der kollagenen Fasern, verglichen mit den normoxischen Kontrolltieren, festzustellen. Diese Ergebnisse erwecken den Verdacht, dass die eNOS KO Mäuse schon unter Normoxie Anzeichen einer maladaptiven Hypertrophie aufweisen, die sich durch den Stimulus der CIH noch verschlechtert. Dieser Verdacht wird zusätzlich durch die physiologischen Erkenntnisse, darunter die knockout-induzierte Links- und Rechtsherzhypertrophie sowie die Hypertonie untermauert.

Weiterhin zeigen die gewonnenen Daten, dass die iNOS KO Mäuse keine pathologische Herzhypertrophie entwickeln, was mit den physiologischen Ergebnissen korreliert. Bemerkenswert ist, dass auch die CIH-exponierten WT Mäuse keinerlei Veränderung des Kollagengehaltes, gemessen an ihren Kontrollen, entwickeln und insgesamt nur einen geringen Ersatz der Kardiomyozyten durch fibrotisches Material (ca. 0,4% Kollagen) zeigen, obwohl diese Tiere sowohl eine Hypertonie, als auch eine Rechtsherzhypertrophie aufweisen. Diese Resultate sprechen dafür, dass die Tiere sich an die Vorgänge unter CIH langsam und adaptiv anpassen können und somit "nur" eine adaptive Herzhypertrophie zeigen.

4.4 Echokardiographisch untersuchte Effekte der CIH auf die WT, iNOS KO und eNOS KO Mäuse

Das OSAS ist eine Erkrankung, die mit einem hohen Risiko für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität einhergeht (**Haruki** 2009). Einen großen Einfluss auf das kardiovaskuläre Geschehen hat die rechtsventrikuläre Funktion, weshalb es notwendig ist, Störungen in der Funktion des rechten Herzens frühzeitig, noch vor Entstehung einer PH zu erkennen um einem terminalen Herzversagen entgegenzuwirken (**Tugcu** 2010). Zusätzlich kann die beim OSAS vorkommende linksventrikuläre Dysfunktion (**Haruki** 2009) einen verstärkenden Effekt auf die Dysfunktion des rechten Herzens haben (**Altekin** 2012). Aus diesen Gründen könnten die anhand von echokardiographischen Untersuchungen ermittelten Parameter (vor allem des rechten Ventrikels), ein möglicher prognostischer Faktor für das OSAS des Menschen sein (**Tugcu** 2010; **Uematsu** 2010; **Altekin** 2012).

Auch für Mäuse ist die transthorakale Echokardiographie eine weitverbreitete nichtinvasive Methode zur Bewertung der Herzfunktion und wird mehr und mehr der Standard zur Charakterisierung des kardialen Phänotyps transgener Tiere (**Roth** 2002). Die in dieser Arbeit errechneten Parameter wurden mittels M-mode, pulsed-wave-Doppler und tissue-Doppler bestimmt. Diese Methoden wurden bereits in anderen Studien für die Bestimmung der systolischen und diastolischen linksventrikulären Funktion (**Yang** 1999; **Zhang** 2007a; **Stypmann** 2009; **Wu** 2010) bzw. Rechtsherzfunktion (**Hardziyenka** 2006; **Lindqvist** 2008; **Kosanovic** 2011; **Kojonazarov** 2013) verwendet.

4.4.1 Auswirkungen der CIH auf die systolische Funktion des Herzens

Zur Bestimmung der systolischen Funktion des Herzens wurde die TAPSE und die peak systolic velocity des linken und rechten Ventrikels sowie die EF, der CO und der CI herangezogen.

Hierbei zeigte sich, dass CIH nur bei den eNOS KO Mäusen zu einer Verschlechterung der systolischen Funktion des Herzens führt, wohingegen sowohl die WT, als auch die iNOS KO Mäuse keinerlei signifikante Änderung der Werte, verglichen mit ihren jeweiligen Kontrollen, erkennen ließen. Dieses Ergebnis war bei allen ermittelten Parametern zu finden. Im Gegensatz zu den Resultaten der WT Mäuse ist bei OSAS-Patienten eine eingeschränkte rechtsventrikuläre Funktion,

errechnet an der Erniedrigung der TAPSE zu beobachten, wie sie auch bei den eNOS KO Mäusen zu finden war. Weiterhin konnte bei dieser Studie eine Verschlechterung der Herzfunktion mit zunehmendem Schweregrad des OSAS, gemessen am AHI ermittelt werden (**Altekin** 2012). Die Unterschiede zwischen Menschen und Mäusen könnten aufgrund von Speziesunterschieden oder der Tatsache, dass die Mäuse in Narkose gemessen wurden hervorgerufen werden.

4.4.2 Auswirkungen der CIH auf die diastolische Funktion des Herzens

Als Parameter für die Bestimmung der diastolischen Funktion des Herzens diene die IVRT, die für beide Herzkammern ermittelt wurde sowie die für den linken Ventrikel berechneten LV E'/A' peak diastolic velocities.

Anhand dieser Parameter konnte nach sechs Wochen CIH sowohl bei den WT Mäusen als auch bei den eNOS KO Mäusen eine verminderte diastolische Herzfunktion beobachtet werden, wohingegen die iNOS KO Mäuse keine Veränderung zeigten. Vergleicht man die errechneten Werte der normoxischen eNOS KO Mäuse mit denen der WT Mäuse, so kann bei den eNOS KO Mäusen bereits unter Normoxie eine Herabsetzung der links- und rechtsventrikulären diastolischen Herzfunktion festgestellt werden, die sich jedoch unter CIH nicht weiter verschlechterte.

Diese Ergebnisse der WT Mäuse hinsichtlich der LV IVRT und der LV E'/A' peak diastolic velocities stimmen mit denen von Patienten, die unter OSAS leiden überein. Es konnte auch bei Patienten mit OSAS, verglichen mit gesunden Personen, eine Erhöhung der linksventrikulären IVRT beobachtet werden, was für eine beeinträchtigte Relaxation und somit eine verminderte Funktion des linken Ventrikels spricht (**Altekin** 2012). Dies konnte durch eine Studie von Haruki et al. bestätigt werden, die bei Menschen mit OSAS ebenfalls eine verminderte Relaxation des linken Herzens, gekennzeichnet durch die verringerten LV E'/A' peak diastolic velocities fanden (**Haruki** 2009).

4.4.3 Auswirkungen der CIH auf die globale Funktion des Herzens

Um die globale Funktion des Herzens zu ermitteln, wurde der MPI sowohl des linken als auch des rechten Ventrikels berechnet. Anhand dieses Parameters ist es möglich, Aussagen über die systolische und die diastolische Herzfunktion zu machen. Dabei scheint der MPI sowohl von Einflüssen des arteriellen Blutdruckes,

gekennzeichnet durch die Nachlast, als auch von der Herzfrequenz unabhängig zu sein (**Schulte** 2004; **Stypmann** 2009).

Nach sechs Wochen CIH zeigten sowohl die WT Mäuse als auch die eNOS KO Mäuse im Gegensatz zu ihren Kontrollgruppen eine verminderte globale Herzfunktion, wohingegen bei den iNOS KO Mäusen keine Veränderung festzustellen war. Zusätzlich war bei den eNOS KO Mäusen schon unter Normoxie eine herabgesetzte Herzfunktion erkennbar, wenn man deren Werte mit denen der normoxischen WT (nur LV) bzw. iNOS KO Mäuse (LV und RV) vergleicht. Diese Beeinträchtigung der globalen Funktion des Herzens der eNOS KO Mäuse verstärkte sich noch, wenn die Tiere den Bedingungen der CIH ausgesetzt waren.

Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch bei Menschen, die unter OSAS leiden finden. In einer Studie von Altekin et al. zeigten Patienten mit OSAS im Gegensatz zu gesunden Probanden einen erhöhten MPI und damit eine herabgesetzte links- und rechtsventrikuläre Herzfunktion, die mit der Schwere der Erkrankung weiter zunahm (**Altekin** 2012).

4.4.4 Interpretation der echokardiographisch ermittelten Daten

Im Falle der WT Mäuse war nach sechs Wochen CIH eine verminderte Relaxation (diastolische Funktion) des linken, ebenso wie des rechten Herzens, bei noch erhaltener Kontraktilität und Pumpfunktion (systolische Funktion) zu sehen. Obwohl die echokardiographisch ermittelten Parameter zur Bestimmung der systolischen Funktion der WT Mäuse keine signifikante Verschlechterung des Herzens erkennen ließen, war bei diesen Tieren eine Beeinträchtigung der globalen Herzfunktion, gekennzeichnet durch die Erhöhung des MPI festzustellen. Ein wichtiger Parameter zur Berechnung des MPI ist die IVRT. Somit kann die Erhöhung des MPI bei den CIH-exponierten WT Mäusen aus der Verlängerung der IVRT resultieren, was auch schon in einer Studie an Menschen mit isolierter diastolischer Dysfunktion beobachtet wurde (**Lakoumentas** 2005). Demnach kann man trotz der Verschlechterung des MPI davon ausgehen, dass die WT Mäuse nur eine diastolische Dysfunktion entwickeln, zumal die systolische Funktion der Herzen dieser Tiere unverändert war, erkennbar an den Parametern TAPSE und peak systolic velocity des linken und rechten Ventrikels sowie anhand der EF, des CO und des CI.

Diese echokardiographisch gewonnen Daten stimmen mit den physiologischen Ergebnissen überein und führen zu der Vermutung, dass die WT Mäuse während einer sechswöchigen CIH eine diastolische Dysfunktion des Herzen entwickeln, hervorgerufen durch die arterielle und pulmonale Hypertonie mit einhergehender Rechtsherzhypertrophie.

Die CIH-exponierten eNOS KO Mäuse weisen eine verschlechterte systolische und diastolische Herzfunktion auf, wobei die diastolische Funktionsminderung auch schon bei den eNOS KO Mäusen zu sehen ist, die unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden. Diese Daten und die physiologischen und histologischen Daten zusammengefasst zeigen, dass die eNOS KO Mäuse infolge des knockouts eine herabgesetzte diastolische Herzfunktion entwickeln, welche mit einer maladaptiven Herzhypertrophie, charakterisiert durch den Fibrosegrad des Herzens und einer arteriellen Hypertonie einhergeht. Zusätzlich weisen die echokardiographisch ermittelten Parameter und der Fibrosegehalt darauf hin, dass sich unter den Bedingungen der CIH die Herzleistung und das kardiale Remodeling weiter verschlechtern.

Dafür, dass die Deletion von eNOS zu einer Dysfunktion des Herzens führt sprechen auch die Daten von Shibata et al., die bei eNOS KO Mäusen eine spontane Linksherzhypertrophie mit assoziierter diastolischer Dysfunktion des Herzen und Hypertonie infolge des knockouts beobachtet haben (**Shibata** 2010). Entsprechende Ergebnisse waren auch bei Rütten et al. zu sehen, in deren Studie eNOS KO Mäuse aufgrund des bandings der Aorta abdominalis einen erhöhten Grad der Fibrose und der Myozytenhypertrophie im Vergleich mit den WT Mäusen zeigten. Auch in dieser Studie entwickelten die Tiere eine schwächere systolische Dysfunktion und eine stärkere diastolische Dysfunktion, was mit den in dieser Arbeit ermittelten Daten übereinstimmt (**Ruetten** 2005).

Im Gegensatz zu den WT und eNOS KO Mäusen blieb die Herzfunktion der iNOS KO Mäuse unter CIH vollständig erhalten. Dies korreliert auch mit den physiologisch und histologisch ermittelten Daten und spricht dafür, dass die Deletion von iNOS eine protektive Wirkung auf das kardiovaskuläre Remodeling unter den Bedingungen der CIH hat. Kardioprotektive Eigenschaften der iNOS-Deletion konnte auch in anderen Studien beobachtet werden. So fanden Dias et al. bei iNOS KO Mäusen mit Herzhypertrophie, hervorgerufen durch Aortenbanding eine verzögert auftretende

Erhöhung der hypertrophen Genmarker und der kontraktilen Dysfunktion (**Dias** 2010). Weiterhin zeigten Zhang et al. bei der TAC (transverse aortic constriction)-induzierten Linksherzhypertrophie, dass iNOS KO Mäuse eine geringere Hypertrophie, Dilatation, Fibrose und Dysfunktion aufweisen als WT Mäuse. Weiterhin zeigte diese Arbeitsgruppe, dass TAC mit einer erhöhten Produktion von ROS einhergeht. Dies ließ die Vermutung zu, dass iNOS eine Quelle für die erhöhte Superoxidbildung ist und somit für den erhöhten oxidativen Stress der WT Mäuse und der damit einhergehenden verschlechterten Herzfunktion verantwortlich ist (**Zhang** 2007b).

4.5 Molekularbiologische Untersuchungen

4.5.1 Genexpression der Enzyme eNOS und iNOS

Im Zuge der molekularbiologischen Untersuchungen wurde zunächst mittels RT-PCR- Analyse ein Screening der entnommenen Gewebe durchgeführt um einen Einblick in die Expression und Regulation der zu untersuchenden Gene zu bekommen. Dabei wurde Gewebe der normoxischen und CIH-exponierten WT Mäuse untersucht. Weder eNOS noch iNOS waren im Gewebehomogenat der Lungen, der linken Ventrikel, der A. pulmonalis sowie der A. renalis auf mRNA-Ebene reguliert. Allerdings war im Falle des rechten Ventrikels und der Aorta unter CIH eine signifikant niedrigere mRNA-Expression beide Gene betreffend zu sehen. Weiterhin zeigte die A. carotis und die A. femoralis unter CIH-Exposition eine Heraufregulation von eNOS (A. carotis) bzw. von beiden Genen (A. femoralis). Dieser Unterschied in der Genregulation in den verschiedenen Gefäßen kann unter Umständen durch deren besonderen Aufbau erklärt werden. So unterscheidet man zwischen Arterien des elastischen Typs (Aorta, A. carotis communis), die herznah liegen und denen des muskulären Typs (A. femoralis). Mit zunehmendem Abstand vom Herzen nimmt die Muskelschicht der Arterien zu und der kollagene Anteil der Intima ab, so dass die herzfernen Gefäße durch eine dicke Muskelschicht und eine geringe Bindegewebsschicht gekennzeichnet sind (**Linß** 1998; **Weyrauch** 1998; **Frömke** 2006). Möglicherweise ist die Lokalisation von eNOS und iNOS in den Wandschichten unterschiedlich stark ausgeprägt, wodurch es zu einer Änderung der Expression kommen kann. Zwar stimmen die in dieser Arbeit ermittelten Unterschiede in der Genexpression nicht vollkommen mit den verschiedenen

Arterientypen überein, allerdings kann ein Einfluss auf die Genexpression dadurch nicht ausgeschlossen werden. Um den genauen Anteil von eNOS oder iNOS in der Gefäßschicht zu lokalisieren müssten weiterführende Analysen (z.B. immunhistochemische Färbung) durchgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit war keine Regulation der eNOS- und iNOS-mRNA-Konzentration der Lunge und des linken Ventrikel, dafür aber eine Herunterregulation im rechten Ventrikel für beide Isoformen detektierbar. Diese Entwicklung stimmt nicht mit den in anderen Studien gewonnenen Ergebnissen überein. So fanden Fagan et al. in einer Studie mit Mäusen, die von Geburt an sechs Wochen unter chronischer hypobarer Hypoxie gehalten wurden, eine Erhöhung des eNOS- und iNOS Expressionswertes in der Lunge verglichen mit normoxischen Kontrolltieren (**Fagan 2001b**).

Eine weitere Studie an Ratten, die für 30 min unter hypobarer Hypoxie und anschließend für eine unterschiedliche Zeitdauer (0, 2, 12, 24, 48, 72 h, und 5 Tage) in Normoxie gehalten wurden, zeigte für Lungengewebe eine Hochregulation der eNOS nach 0h und 2h Reoxygenierung sowie der iNOS nach 2h, 12h und 24h Normoxie. Für die anderen Reoxygenierungszeiten sanken die Expressionswerte auf das Basalniveau der Kontrollen ab und zeigten keine weitere Veränderung (**Rus 2010**). Ähnliche Ergebnisse konnte diese Arbeitsgruppe auch für das Herz beobachten. Hierfür war ein signifikanter Anstieg der iNOS und eNOS-Expression direkt nach Exposition in akuter, hypobarer Hypoxie festzustellen, der anschließend ebenfalls auf das Basalniveau zurücksank und keine Regulation der anderen Reoxygenierungszeiten erkennen ließ (**Rus 2011**). Die NO-Synthasen werden also sowohl in der Lunge als auch im Herzen während akuter Hypoxie hochreguliert und anschließend wieder herunterreguliert. Unterschiede der genannten zu der eigenen Studie liegen insbesondere darin, dass hier die CIH zur Anwendung kommt und dass diese zu Veränderungen in der NOS-Regulierung führen kann. So kann z.B. der Stimulus einer sechswöchigen chronischen, hypobaren Hypoxie wesentlich stärker sein als der einer intermittierenden, normobaren Hypoxie. Weiterhin kann der Reiz in der akuten Phase der Hypoxie eine andere Reaktion hervorrufen als die CIH. Ferner ist die Hochregulation der eNOS- und iNOS-mRNA-Expression von der anschließenden Reoxygenierungszeit abhängig, wie die Studien von Rus et al. zeigten (**Rus 2010**; **Rus 2011**).

4.5.2 Proteinexpression der Enzyme eNOS und iNOS

Da es infolge von transkriptionalen, posttranskriptionalen und posttranslationalen Regulationen zu einer Beeinflussung der Expression von mRNA und Proteinen kommen kann (z.B. Scherkräfte (eNOS), Phosphorylierung, Glykosylierung (**Korhonen** 2007; **Balligand** 2009)) sind PCR-Analysen nicht ausreichend, um gesicherte Aussagen über die Regulation der eNOS- und iNOS-Expression zu treffen. Aus diesem Grund wurde als nächster Schritt dieser Arbeit westernblot-Analysen von Lunge, linkem und rechtem Ventrikel der WT Mäuse durchgeführt. Auf die Gefäßanalysen wurde in diesem Fall verzichtet, da zur Detektion der eNOS- und iNOS-Bande eine große Menge Protein (100-150µg) geladen werden musste, was anhand der geringen Gefäßmenge nicht möglich war. Auch auf Proteinebene waren weder eNOS noch iNOS im Lungenhomogenat der CIH-exponierten Mäuse reguliert. Die westernblot-Analyse von eNOS für die Lunge stimmt mit den Ergebnissen von Fagan et al. überein. Hier zeigten Mäuse, die von Geburt an sechs Wochen unter chronischer hypobarer Hypoxie gehalten wurden keine signifikante Erhöhung des eNOS-Expressionswertes in der Lunge, verglichen mit den normoxischen (Umgebungsbedingungen) Kontrolltieren. Allerdings war bei den Mäusen dieser Studie, die hyperbarer Normoxie (Meereshöhe) ausgesetzt waren ein geringerer eNOS-Expressionswert als bei Tieren unter normobarer Normoxie (Umgebungsbedingungen) festzustellen (**Fagan** 2001b). Andere Ergebnisse zeigte die Studie von Li et al., bei der C57BL/6J Mäuse sechs Tage lang in normobarer Hypoxie (10% O₂) bzw. Normoxie gehalten wurden. Die hypoxischen Mäuse wiesen für eNOS und für iNOS eine Erhöhung der Proteinexpression, verglichen mit den normoxischen Tieren auf (**Li** 2001). Im Gegensatz dazu zeigten Ratten in normobarer Hypoxie (10-11% O₂) nach einer Woche keine Veränderung des eNOS-Expressionswertes. Nach dreiwöchiger Hypoxieexposition war jedoch ein Anstieg der eNOS in der Lunge zu beobachten (**Murata** 2005). Dieses Ergebnis wurde durch Le Cras et al. bestätigt, die bei Ratten nach drei Wochen Hypoxie (10% O₂) gegenüber den normoxischen Tieren einen Anstieg der eNOS und der iNOS im Lungenhomogenat gefunden haben (**Le Cras** 1996).

Die bereits unter 4.5.1 erwähnte Studie von Rus et al., die Ratten für 30 min unter hypobarer Hypoxie und anschließend für eine unterschiedliche Zeitdauer (0, 2, 12, 24, 48, 72 h, und 5 Tage) in Normoxie gehalten haben, zeigte auch für die

Proteinexpression eine zeitlich abhängige Regulation. Im Falle der eNOS war für das Lungengewebe eine Hochregulation nach 0h Reoxygenierung zu sehen, die anschließend auf das normoxische Basalniveau zurückfiel und keine weitere Veränderung zeigte. Die iNOS wies erst nach 48h Normoxie einen Anstieg im Expressionswert des Lungengewebes auf, der sich für die weiteren Zeitpunkte von 72h und fünf Tagen weiter erhöhte (**Rus** 2010). Weiterhin zeigte diese Arbeitsgruppe für das gesamte Herz eine Hochregulation der eNOS nach einer Reoxygenierungszeit von 0h, 2h und 12h sowie der iNOS für alle gemessenen Zeitpunkte (**Rus** 2011). Auch eine Studie von Grilli et al. beobachtete bei Ratten, die für eine oder zwei Wochen der Hypoxie (10% O₂) ausgesetzt waren, eine erhöhte iNOS-Proteinexpression im Herzen (**Grilli** 2003). Diese Resultate stimmen mit den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Ergebnissen überein. Hierbei war die Proteinexpression von eNOS und iNOS in den linken Ventrikeln sowie in den rechten Ventrikeln (nur iNOS) der CIH-exponierten Mäuse signifikant höher als bei den normoxischen Kontrolltieren.

Die Unterschiede der aufgeführten Studien in den Expressionswerten der Lunge zu der eigenen Studie liegen insbesondere darin, dass für die vorliegende Arbeit die CIH verwendet wurde und dass diese zu Unterschieden in der NOS-Regulierung führen kann. Weiterhin weisen die verschiedenen Experimente eine andere Zeitkinetik der Hypoxie und Reoxygenierung sowie unterschiedliche Sauerstoffpartial- und Luftdrücke auf. So fanden Snow et al. heraus, dass die eNOS-Proteinexpression in intrapulmonalen Arterien bei Ratten, die zwei Wochen intermittierender hypokapnischer Hypoxie (5% O₂ alle 90 sec) und chronischer hypobarer Hypoxie (12% O₂) ausgesetzt waren im Vergleich zu den normoxischen Tieren signifikant erhöht war, wohingegen keine Regulation unter den Bedingungen der intermittierenden, eukapnischen Hypoxie (5% O₂ alle 90 sec) zu beobachten war (**Snow** 2008). Des Weiteren scheint die Hochregulation der eNOS- und iNOS-Proteinexpression des Herzens nach Reoxygenierung länger anzudauern als in der Lunge. Dadurch weisen möglicherweise die Ergebnisse mehrerer Studien die Expressionswerte des Herzens betreffend eine größere Homogenität auf. Auch besteht das Lungenhomogenat aus mehreren verschiedenen Zelltypen, welche Unterschiede in der Expression von eNOS oder iNOS zeigen können. So ist bereits

bekannt, dass die Regulation der iNOS-Expression spezie- und zelltypabhängig ist (**Pautz** 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit keine Regulation von eNOS oder iNOS in der Lunge festgestellt werden konnte, jedoch für das Herz sowohl eine Hochregulation der iNOS, als auch der eNOS (nur im linken Ventrikel) der WT Mäuse zu finden war. Dieses Resultat spricht dafür, dass die exzessive iNOS-Produktion unter CIH einen schädlichen Effekt auf das Herz hat. Ein solcher negativer Effekt der iNOS auf das Herz wurde bereits in der Literatur beschrieben (**Satoh** 1997; **Mungrue** 2002; **Liu** 2005; **Zhang** 2007b) und kann dadurch erklärt werden, dass iNOS, als Quelle für eine exzessive NO-Produktion und der damit einhergehenden ROS-Bildung, einen enormen Einfluss auf die Entstehung von oxidativem Stress hat (**Liu** 2005; **Zhang** 2007b; **Jelic** 2008). Hierbei kommt es nach dem Einsetzen des Stimulus (inflammatorischer Reiz, Endotoxine und Cytokine) zu einer übermäßigen NO-Produktion mit einhergehender Bildung von ROS, darunter Peroxynitrit und Superoxid. Da iNOS auch in Herzmyozyten exprimiert ist kann es anhand von diesen Radikalen zu einer Schädigung des Herzens kommen (**Liu** 2005).

Die Hochregulation von eNOS im linken Ventrikel kann ebenfalls entscheidend zur Entwicklung eines kardialen Phänotyps beitragen. Wie bereits unter 1.6 beschrieben hat NO unter normalen Bedingungen eine vasoprotektive Funktion, die aufgrund mehrerer Faktoren (NO-Inaktivierung, BH₄-Mangel, eNOS-Entkopplung) im Rahmen der endothelialen Dysfunktion in eine gefäßschädigende Wirkung umschlagen kann (**Vásquez-Vivar** 1998; **Förstermann** 2006). Eine solche Hochregulation der eNOS wurde auch schon bei anderen kardiovaskulären Erkrankungen in Gegenwart von oxidativem Stress sowie einer erniedrigten NO-Verfügbarkeit beobachtet (**Bouloumié** 1997; **Bauersachs** 1999; **Patt** 2010) und führt zu der Vermutung, dass die endotheliale Dysfunktion nicht mit einer geringeren eNOS-Expression einhergehen muss (**Patt** 2010).

Der Zusammenhang zwischen der Entwicklung eines kardialen Phänotyps und der Hochregulation der iNOS-Expression sowie der Entstehung von oxidativem Stress und NO-Inaktivierung unter CIH muss aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Daten rein spekulativ bleiben. Um genaue Aussagen über die NO-und ROS-

Produktion unter CIH machen zu können wären weitere Untersuchungen nötig (ROS-Messung, NO-Messung, Immunhistochemie).

4.6 Resümee der kardialen Befunde

Die vorliegende Arbeit demonstriert, dass eNOS und iNOS eine wichtige Funktion in der Pathogenese des OSAS und den damit einhergehenden Herzkreislauf-Erkrankungen darstellt. So konnte für die WT und eNOS KO Mäuse gezeigt werden, dass sie unter CIH eine arterielle (nur WT) und pulmonale Hypertonie entwickeln, die mit einer Dysfunktion des linken und rechten Ventrikels sowie einer Rechtsherzhypertrophie einhergeht. Weiterhin führt die Deletion der iNOS zu einer Protektion der Herzfunktion und zu einem weniger stark ausgeprägten pulmonalen Remodeling. Die erhöhte Proteinexpression von iNOS und in geringerem Maße auch von eNOS im Herzen der CIH-exponierten WT Mäuse impliziert, dass diese Isoformen aufgrund ihres Beitrags zur Entstehung von oxidativem Stress und endothelialer Dysfunktion entscheidend an der Ausbildung des kardialen Phänotyps beteiligt sein können.

5. Zusammenfassung

Das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom des Menschen ist eine weitverbreitete Erkrankung, die durch Episoden intermittierender Hypoxämie charakterisiert ist. Chronisch intermittierende Hypoxie ist ein wichtiger Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, darunter arterielle und pulmonale Hypertonie. Die PH ist eine schwerwiegende Erkrankung mit schlechter Prognose, die in einer kardialen Dysfunktion mit terminaler rechtsventrikulärer Dekompensation gipfeln kann. Weiterhin kann systemischer Bluthochdruck zu einer linksventrikulären Hypertrophie führen, die zu einer systolischen und diastolischen Einschränkung der Herzfunktion mit nachfolgender Herzinsuffizienz führen kann. Momentan ist noch keine medikamentöse Therapie zur Behandlung des OSAS verfügbar. Die derzeitigen Behandlungsmethoden führen zwar zu einer Verbesserung der Symptome, jedoch ist darunter keine Therapie, die von allen Patienten akzeptiert wird und die die Ursachen der Entstehung der Herzkreislauferkrankung, der wesentlichen Todesursache, beseitigt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von eNOS und iNOS in der Pathogenese der Herzkreislauferkrankung, darunter die arterielle und pulmonale Hypertonie, bei dem Krankheitsbild OSAS aufzuklären. Dazu wurden eNOS und iNOS KO Mäuse im Tiermodell der chronisch intermittierenden Hypoxie untersucht. Tägliche Blutdruckmessungen, echokardiographische und histologische Untersuchungen sowie die Ermittlung unterschiedlicher Parameter zur Analyse der Herzhypertrophie zeigten, dass eNOS KO Mäuse bereits unter Normoxie eine Dysfunktion des Herzens aufweisen, welche sich unter CIH weiter verschlechtert. Weiterhin zeigen diese Mäuse schon zu Beginn der Studie eine Hypertonie, welche sich allerdings unter CIH-Exposition nicht weiter verstärkte. Stattdessen war ein Blutdruckabfall, besonders des systolischen Blutdruckes zu erkennen. Allerdings ging dem Blutdruckabfall der CIH-exponierten eNOS KO Mäuse ein leichter Anstieg des Blutdruckes (insbesondere des diastolischen Blutdruckes) voraus. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der eNOS KO Mäuse führte die Deletion von iNOS im Mausmodell der CIH zu einer protektiven Wirkung auf die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie bzw. eines kardialen Phänotyps. Außerdem zeigten die morphologische Analysen der Lungengefäße, dass die iNOS KO Mäuse ein

geringeres pulmonales Remodeling aufweisen und damit eine weniger stark ausgeprägte PH entwickeln als die WT Mäuse. Die positive Wirkung der Deletion von iNOS auf das Herz wird durch die Ergebnisse der westernblot-Analysen noch erhärtet. So spricht die erhöhte Proteinexpression von iNOS und in geringerem Maße auch von eNOS im Herzen dafür, dass die Überexpression dieser Isoformen im Rahmen der CIH entscheidend an der Ausbildung des kardialen Phänotyps beteiligt sind.

6. Summary

Obstructive sleep apnoea syndrome is a common disorder which is characterized by intermittent episodes of hypoxemia. Chronic intermittent hypoxia is an important risk factor for the pathogenesis of cardiovascular diseases like high systemic blood pressure and PH. Pulmonary hypertension is a severe disease with poor prognosis which can result in dysfunction and ultimately decompensation of the right heart. Furthermore, systemic hypertension can cause left ventricular hypertrophy, which can lead to a reduction of systolic and diastolic cardiac function with subsequent heart failure. To date, no drug therapy for the treatment of OSAS exists. Current treatments improve symptoms, but there is no therapy that is accepted by all patients and that eliminates cardiovascular disease, the main cause of death of OSAS patients.

The aim of the present study was to investigate the role of eNOS and iNOS in the pathogenesis of cardiovascular disease, including pulmonary and systemic hypertension due to OSAS. For that purpose eNOS and iNOS knockout mice were investigated in an animal model of chronic intermittent hypoxia, a commonly used model to study OSAS. Daily blood pressure measurements, echocardiographic and histological studies, as well as the determination of different heart ratios showed that eNOS knockout mice exhibit a dysfunction of the heart in normoxia, which worsens further under conditions of CIH. In contrast, the deletion of iNOS in the mouse model of CIH leads to a protective effect on the development of systemic hypertension and cardiac function. Furthermore, the morphological analyses of pulmonary vessels reveal that iNOS knockout mice have minor pulmonary remodeling and therefore develop a less severe PH than WT mice. The positive effect on the heart, caused by deletion of iNOS, was confirmed by the results of the protein expression analysis. Thus, the increased protein expression of iNOS and to a lesser extent of eNOS in the heart suggests that the development of the cardiac phenotype concerning OSAS may be partly due to a pathological expression of eNOS and iNOS.

7 Literaturverzeichnis

- AASM** (1999). "Sleep-related breathing disorders in adults: recommendations for syndrome definition and measurement techniques in clinical research. The report of an american academy of sleep medicine task force." Sleep. **22**(5): 667-689.
- Alchanatis, M., Tourkhoriti, G, Kakouros, S, Kosmas, E, Podaras, S, Jordanoglou, JB.** (2001). "Daytime pulmonary hypertension in patients with obstructive sleep apnea: the effect of continuous positive airway pressure on pulmonary hemodynamics." Respiration. **68**(6): 566-572.
- Altekin, R., Karakas, MS, Yanikoglu, A, Ozel, D, Ozbudak, O, Demir, I, Deger, N.** (2012). "Determination of right ventricular dysfunction using the speckle tracking echocardiography method in patients with obstructive sleep apnea." Cardiol J. **19**(2): 130-139.
- Ayas, N., FitzGerald, JM, Fleetham, JA, White, DP, Schulzer, M, Ryan, CF, Ghaeli, R, Mercer, GW, Cooper, P, Tan, MC, Marra, CA.** (2006). "Cost-effectiveness of continuous positive airway pressure therapy for moderate to severe obstructive sleep apnea/hypopnea." Arch Intern Med. **166**(9): 977-984.
- Balligand, J., Feron, O, Dessy, C.** (2009). "eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues." Physiol Rev. **89**(2): 481-534.
- Banno, K., Kryger, MH.** (2007). "Sleep apnea: Clinical investigations in humans." Sleep Med. **8**(4): 400-426.
- Bauersachs, J., Bouloumié, A, Fraccarollo, D, Hu, K, Busse, R, Ertl, G.** (1999). "Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production." Circulation. **100**(3): 292-298.
- Bazzano, L., Khan, Z, Reynolds, K, He, J.** (2007). "Effect of nocturnal nasal continuous positive airway pressure on blood pressure in obstructive sleep apnea." Hypertension. **50**: 417-423.
- Berman, E., DiBenedetto, RJ, Causey, DE, Mims, T, Conneff, M, Goodman, LS, Rollings, RC.** (1991). "Right ventricular hypertrophy detected by echocardiography in patients with newly diagnosed obstructive sleep apnea." Chest. **100**(2): 347-350.
- Bernardo, B., Weeks, K L, Pretorius, L, McMullen, JR.** (2010). "Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies." Pharmacol Ther. **128**: 191-227.
- Bonsignore, M., Marrone, O, Insalaco, G, Bonsignore, G.** (1994). "The cardiovascular effects of obstructive sleep apnoeas: analysis of pathogenic mechanisms." Eur Respir J. **7**(4): 786-805.
- Borbély, A.** (1998, Ausgabe für das Internet). "Das Geheimnis des Schlafs. Neue Wege und Erkenntnisse der Forschung." Universität Zürich.
- Boudewyns, A., Marklund, M, Hochban, W** (2007). "Alternatives for OSAHS treatment: selection of patients for upper airway surgery and oral appliances." Eur Respir Rev. **16**(106): 132-145.

- Bouloumié, A., Bauersachs, J, Linz, W, Schölkens, BA, Wiemer, G, Fleming, I, Busse R.** (1997). "Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production." Hypertension. **30**(4): 934-941.
- Bradley, T., Martinez, D, Rutherford, R, Lue, F, Grossman, RF, Moldofsky, H, Zamel, N, Phillipson, EA.** (1985). "Physiological determinants of nocturnal arterial oxygenation in patients with obstructive sleep apnea." J Appl Physiol. **59**(5): 1364-1368.
- Brooks, D., Horner, RL, Kimoff, RJ, Kozar, LF, Render-Teixeira, CL, Phillipson, EA.** (1997). "Effect of obstructive sleep apnea versus sleep fragmentation on responses to airway occlusion." Am J Respir Crit Care Med. **155**(5): 1609-1617.
- BTS** (2007). "NICE technology appraisal – nasal continuous positive airway pressure for the treatment of obstructive sleep apnoea. Submission from British Thoracic Society."
- Buchwald, H., Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, Schoelles K.** (2004). "Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis." JAMA. **292**(14): 1724-1737.
- Campen, M., Shimoda, LA, O'Donnell, CP.** (2005). "Acute and chronic cardiovascular effects of intermittent hypoxia in C57BL/6J mice." J Appl Physiol. **99**(5): 2028-2035.
- Carlson, J., Hedner, JA, Ejnell, H, Peterson, LE.** (1994). "High prevalence of hypertension in sleep apnea patients independent of obesity." Am J Respir Crit Care Med. **150**(1): 72-77.
- Chalmers, J. M. S., Mancia G, Whitworth J, Beilin L, Hansson L, Neal B, Rodgers A, Ni Mhurchu C, Clark T.** (1999). "1999 World Health Organization-international society of hypertension guidelines for the management of hypertension. Guidelines sub-committee of the World Health Organization." J Hypertens. **17**: 151-185.
- Chan, A., Lee RW, Cistulli PA.** (2008). "Non-positive airway pressure modalities: mandibular advancement devices/positional therapy." Proc Am Thorac Soc. **5**(2): 179-184.
- Chaouat, A., Weitzenblum, E, Krieger, J, Oswald, M, Kessler, R.** (1996). "Pulmonary hemodynamics in the obstructive sleep apnea syndrome. Results in 220 consecutive patients." Chest. **109**(2): 380-386.
- Chen, L., Einbinder, E, Zhang, Q, Hasday, J, Balke, CW, Scharf, SM.** (2005). "Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats." Am J Respir Crit Care Med. **172**(7): 915-920.
- Chen, L., Shi, Q, Scharf, SM.** (2000). "Hemodynamic effects of periodic obstructive apneas in sedated pigs with congestive heart failure." J Appl Physiol. **88**(3): 1051-1060.
- Chung, F., Liao, P, Elsaid, H, Islam, S, Shapiro, CM, Sun, Y.** (2012). "Oxygen desaturation index from nocturnal oximetry: a sensitive and specific tool to detect sleep-disordered breathing in surgical patients." Anesth Analg. **114**(5): 993-1000.
- Conradt, R., Hochban, W, Brandenburg, U, Heitmann, J, Peter, JH.** (1997). "Long-term follow-up after surgical treatment of obstructive sleep apnoea by maxillomandibular advancement." Eur Respir J. **10**: 123-128.

- Dahal, B., Heuchel, R, Pullamsetti, SS, Wilhelm, J, Ghofrani, HA, Weissmann, N, Seeger, W, Grimminger, F, Schermuly, RT.** (2011). "Hypoxic pulmonary hypertension in mice with constitutively active platelet-derived growth factor receptor- β ." Pulm Circ. **1**(2): 259-268.
- Damy, T., Paulino, A, Margarit, L, Drouot, X, Stoica, M, Vermes, E, Gueret, P, Adnot, S, Rande, JL, D'Ortho, MP, Hittinger, L.** (2011). "Left ventricle remodelling is associated with sleep-disordered breathing in non-ischaemic cardiopathy with systolic dysfunction." J Sleep Res. **20**: 101-109.
- Dematteis, M., Godin-Ribuot, D, Arnaud, C, Ribuot, C, Stanke-Labesque, F, Pépin, JL, Lévy, P.** (2009). "Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease." ILAR J. **50**(3): 262-281.
- Dias-Junior, C., Cau, Stefany Bruno de Assis, Tanus-Santos, JE.** (2008). "Role of nitric oxide in the control of the pulmonary circulation: physiological, pathophysiological, and therapeutic implications." J Bras Pneumol. **34**(6): 412-419.
- Dias, F., Urboniene, D, Yuzhakova, MA, Biesiadecki, BJ, Pena, JR, Goldspink, PH, Geenen, DL, Wolska, BM.** (2010). "Ablation of iNOS delays cardiac contractile dysfunction in chronic hypertension." Front Biosci (Elite Ed). **2**: 312-314.
- Drager, L., Jun, JC, Polotsky, VY.** (2010). "Metabolic consequences of intermittent hypoxia: relevance to obstructive sleep apnea." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. **24**(5): 843-851.
- Dyugovskaya, L., Lavie, P, Lavie, L.** (2003). "Phenotypic and functional characterization of blood gamma delta T cells in sleep apnea." Am J Respir Crit Care Med. **168**(2): 242-249.
- Eisele, H., Weissmann, N, Hackemack, S Seeger, W, Schulz, R** (2006). "Ein Mausmodell der obstruktiven Schlaf-Apnoe." Pneumologie.: 60 - A64.
- Fagan, K.** (2001a). "Selected contribution: pulmonary hypertension in mice following intermittent hypoxia." J Appl Physiol. **90**(6): 2502-2507.
- Fagan, K., Morrissey, B, Fouty, BW, Sato, K, Harral, JW, Morris, KG Jr, Hoedt-Miller, M, Vidmar, S, McMurtry, IF, Rodman, DM.** (2001b). "Upregulation of nitric oxide synthase in mice with severe hypoxia-induced pulmonary hypertension." Respir Res. **2**(5): 306-313.
- Faller, D.** (1999). "Endothelial cell responses to hypoxic stress." Clin Exp Pharmacol Physiol. **26**(1): 74-84.
- Farre, R., Rotger, M, Montserrat, JM, Calero, G, Navajas, D.** (2003). "Collapsible upper airway segment to study the obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome in rats." Respir Physiol Neurobiol. **136**(2-3): 199-209.
- Ferguson, K., Cartwright, R, Rogers, R, Schmidt-Nowara, W.** (2006). "Oral appliances for snoring and obstructive sleep apnea: a review." Sleep. **29**(2): 244-262.
- Fletcher, E., Lesske, J, Qian, W, Miller, CC , Unger, T.** (1992). "Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats." Hypertension. **19**(6 Pt 1): 555-561.
- Förstermann, U.** (2006). "Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal." Biol Chem. **387**(12): 1521-1533.

- Franklin, K., Anttila, H, Axelsson, S, Gislason, T, Maasilta, P, Myhre, KI, Rehnqvist, N.** (2009). "Effects and side-effects of surgery for snoring and obstructive sleep apnea--a systematic review." Sleep. **32**(1): 27-36.
- Frömke, J.** (2006). Bedeutung und Funktion des Kreislaufs. Standardoperationen in der Gefäßchirurgie. Steinkopff Verlag Darmstadt: 3-4.
- Fukumoto, Y., Shimokawa, H.** (2011). "Recent progress in the management of pulmonary hypertension." Circ J. **75**: 1801-1810.
- Galiè, N., Hoeper, MM, Humbert, M, Torbicki, A, Vachiery, JL, Barbera, JA, Beghetti, M, Corris, P, Gaine, S, Gibbs, JS, Gomez-Sanchez, MA, Jondeau, G, Klepetko, W, Opitz, C, Peacock, A, Rubin, L, Zellweger, M, Simonneau, G; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG).** (2009). "Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT)." Eur Heart J. **30**(20): 2493-2537.
- Ghofrani, H., Pepke-Zaba, J, Barbera, JA, Channick, R, Keogh, AM, Gomez-Sanchez, MA, Kneussl, M, Grimminger, F.** (2004). "Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension." J.Am.Coll.Cardiol. **43**(12 Suppl S): 68S-72S.
- Greenberg, H., Ye, X, Wilson, D, Htoo, AK, Hendersen, T, Liu, SF.** (2006). "Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappaB in cardiovascular tissues in vivo." Biochem Biophys Res Commun. **343**(2): 591-596.
- Grilli, A., De Lutiis, MA, Patruno, A, Speranza, L, Cataldi, A, Centurione, L, Taccardi, AA, Di Napoli, P, De Caterina, R, Barbacane, R, Conti, P, Felaco, M.** (2003). "Effect of chronic hypoxia on inducible nitric oxide synthase expression in rat myocardial tissue." Exp Biol Med (Maywood). **228**(8): 935-942.
- Hardziyenka, M., Campian, ME, de Bruin-Bon, HA, Michel, MC, Tan, HL** (2006). "Sequence of echocardiographic changes during development of right ventricular failure in rat." J Am Soc Echocardiogr. **19**: 1272-1279.
- Haruki, N., Takeuchi, M, Nakai, H, Kanazawa, Y, Tsubota, N, Shintome, R, Lang, RM, Otsuji, Y.** (2009). "Overnight sleeping induced daily repetitive left ventricular systolic and diastolic dysfunction in obstructive sleep apnoea: quantitative assessment using tissue Doppler imaging." Eur J Echocardiogr. **10**(6): 769-775.
- Hawrytkiewicz, I., Sliwiński, P, Górecka, D, Pływaczewski, R, Zieliński, J.** (2004). "Pulmonary haemodynamics in patients with OSAS or an overlap syndrome." Monaldi Arch Chest Dis. **61**(3): 148-152.
- Hendricks, J., Kline, LR, Kovalski, RJ, O'Brien, JA, Morrison, AR, Pack AL.** (1987). "The English bulldog: a natural model of sleep-disordered breathing." J Appl Physiol. **63**(4): 1344-1350.
- Hill, B., Dranka, BP, Bailey, SM, Lancaster, JR, Darley-USmar, VM.** (2010). "What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology." The Journal of Biological Chemistry **285**: 19699-19704.
- Hochban, W., Conradt, R, Brandenburg, U, Heitmann, J, Peter, JH.** (1997). "Surgical maxillofacial treatment of obstructive sleep apnea." Plast Reconstr Surg. **99**(3): 619-626.

- Hoeper, M.** (2009). "The new definition of pulmonary hypertension." Eur Respir J. **34**: 790-791.
- Howard, L.** (2011). "Prognostic factors in pulmonary arterial hypertension: assessing the course of the disease." Eur Respir Rev. **20**: 236-242.
- Huber, F., Beise, U** (2011). "Guideline Hypertonie." medix schweiz.
- Humbert, M.** (2008). "Update in pulmonary arterial hypertension 2007." Am J Respir Crit Care Med. **177**: 574-579.
- Humbert, M.** (2009). "Update in pulmonary hypertension 2008." Am J Respir Crit Care Med Vol. **179**: 650-656.
- Humbert, M., Morrell, NW, Archer, SL, Stenmark, KR., MacLean, MR, Lang, IM, Christman, BW, Weir, EK, Eickelberg, O, Voelkel, NF. et al.** (2004). "Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension." J Am Coll Cardiol. **43**(12): 13-24.
- Iiyori, N., Alonso, LC, Li, J, Sanders, MH, Garcia-Ocana, A, O'Doherty, RM, Polotsky, VY, O'Donnell, CP** (2007). "Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity. ." Am J Respir Crit Care Med. **175**: 851-857.
- Ip, M., Lam, B, Chan, LY, Zheng, L, Tsang, KW, Fung, PC, Lam, WK.** (2000). "Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure." Am J Respir Crit Care Med. **162**(6): 2166-2171.
- Jelic, S., Padeletti, M, Kawut, SM, Higgins, C, Canfield, SM, Onat, D, Colombo, PC, Basner, RC, Factor, P, LeJemtel, TH.** (2008). "Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea." Circulation. **117**(17): 2270-2278.
- JNC-7-Guidelines** (2004). "The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure - complete report."
- Jonigk, D., Hoeper, MM, Kreipe, H, Langer, F.** (2012). "Histopathological aspects of pulmonary hypertension." Pathologe. **33**: 183-191.
- Jun, J., Polotsky, VY.** (2007). "Sleep-disordered breathing and metabolic effects: evidence from animal models. ." Sleep Med Clin. **2**(2): 263-277.
- Jun, J., Polotsky, VY.** (2009). "Metabolic consequences of sleep-disordered breathing." ILAR J. **50**(3): 289-306.
- Jun, J., Savransky, V, Nanayakkara, A, Bevans, S, Li, J, Smith, PL, Polotsky, VY** (2008). "Intermittent hypoxia has organ-specific effects on oxidative stress." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. **295**(4): 1274-1281.
- Kessler, R., Chaouat, A, Weitzenblum, E, Oswald, M, Ehrhart, M, Apprill, M, Krieger, J.** (1996). "Pulmonary hypertension in the obstructive sleep apnoea syndrome: prevalence, causes and therapeutic consequences." Eur Respir J. **9**: 787-794.
- Khaleghi, M., Singletary, LA, Kondragunta, V, Bailey, KR, Turner, ST, Mosley, TH Jr, Kullo, IJ.** (2009). "Haemostatic markers are associated with measures of vascular disease in adults with hypertension." J Hum Hypertens. **23**(8): 530-537.
- Kimoff, R., Makino, H, Horner, RL, Kozar, LF, Lue, F, Slutsky, AS, Phillipson, EA.** (1994). "Canine model of obstructive sleep apnea: model description and preliminary application." J Appl Physiol. **76**(4): 1810-1817.

- Kober, J., Tomkowski, W, Fijałkowska, A, Koziej, M, Filipecki, S, Zieliński, J.** (1996). "[Echocardiographic analysis of cardiac size and function in patients with severe obstructive sleep apnea]." Pneumonol Alergol Pol. **64 Suppl 2**: 187-192.
- Kojonazarov, B., Sydykov, A, Pullamsetti, SS, Luitel, H, Dahal, BK, Kosanovic, D, Tian, X, Majewski, M, Baumann, C, Evans, S, Phillips, P, Fairman, D, Davie, N, Wayman, C, Kilty, I, Weissmann, N, Grimminger, F, Seeger, W, Ghofrani, HA, Schermuly, RT.** (2013). "Effects of multikinase inhibitors on pressure overload-induced right ventricular remodeling." Int J Cardiol. [Epub ahead of print] **167**(6): 2630-2637.
- Korhonen, R., Linker, K, Pautz, A, Förstermann, U, Moilanen, E, Kleinert, H.** (2007). "Post-transcriptional regulation of human inducible nitric-oxide synthase expression by the Jun N-terminal kinase." Mol Pharmacol. **71**(5): 1427-1434.
- Kosanovic, D., Kojonazarov, B, Luitel, H, Dahal, BK, Sydykov, A, Cornitescu, T, Janssen, W, Brandes, RP, Davie, N, Ghofrani, HA, Weissmann, N, Grimminger, F, Seeger, W, Schermuly, RT.** (2011). "Therapeutic efficacy of TBC3711 in monocrotaline-induced pulmonary hypertension." Respir Res. **12**(1): 87.
- Krollner, B.** (2013a). "ICD-10-GM Version 2013 Systematisches Verzeichnis. Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision - German Modification -." from <http://www.icd-code.de/icd/code/G47.-.html>.
- Krollner, B.** (2013b). "ICD-10-GM Version 2013 Systematisches Verzeichnis Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision - German Modification -." from <http://www.icd-code.de/icd/code/I10-I15.html>.
- Kushida, C., Littner, MR, Hirshkowitz, M, Morgenthaler, TI, Alessi, CA, Bailey, D, Boehlecke, B, Brown, TM, Coleman, J Jr, Friedman, L, Kapen, S, Kapur, VK, Kramer, M, Lee-Chiong, T, Owens, J, Pancer, JP, Swick, TJ, Wise, MS; American Academy of Sleep Medicine.** (2006). "Practice parameters for the use of continuous and bilevel positive airway pressure devices to treat adult patients with sleep-related breathing disorders." Sleep. **29**(3): 375-380.
- Kushida, C., Morgenthaler, TI, Littner, MR, Alessi, CA, Bailey, D, Coleman, J Jr, Friedman, L, Hirshkowitz, M, Kapen, S, Kramer, M, Lee-Chiong, T, Owens, J, Pancer JP; American Academy of Sleep.** (2006). "Practice parameters for the treatment of snoring and obstructive sleep apnea with oral appliances: an update for 2005." Sleep. **29**(2): 240-243.
- Lakoumentas, J., Panou, FK, Kotseroglou, VK, Aggeli, KI, Harbis, PK.** (2005). "The Tei index of myocardial performance: applications in cardiology." Hellenic J Cardiol. **46**(1): 52-58.
- Laubach, V., Shesely, EG, Smithies, O, Sherman, PA.** (1995). "Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death." Proc Natl Acad Sci U S A. **92**(23): 10688-10692.
- Le Cras, T., Xue, C, Rengasamy, A, Johns, RA** (1996). "Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung." Am J Physiol. **270**: 163-170.

- Lee, E., Woodske, ME, Zou, B, O'Donnell, CP.** (2009). "Dynamic arterial blood gas analysis in conscious, unrestrained C57BL/6J mice during exposure to intermittent hypoxia." J Appl Physiol. **107**(1): 290-294.
- Li, D., Laubach, VE, Johns, RA.** (2001). "Upregulation of lung soluble guanylate cyclase during chronic hypoxia is prevented by deletion of eNOS." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. **281**(2): L369-376.
- Li, J., Savransky, V, Nanayakkara, A, Smith, PL, O'Donnell, CP, Polotsky, VY.** (2007). "Hyperlipidemia and lipid peroxidation are dependent on the severity of chronic intermittent hypoxia." J Appl Physiol. **102**: 557-563.
- Li, J., Thorne, LN, Punjabi, NM, Sun, CK, Schwartz, AR, Smith, PL, Marino, RL, Rodriguez, A, Hubbard, WC, O'Donnell, CP, Polotsky, VY.** (2005). "Intermittent hypoxia induces hyperlipidemia in lean mice." Circ Res. **97**(7): 698-706.
- Lin, H., Friedman, M, Chang, HW, Gurpinar, B.** (2008). "The efficacy of multilevel surgery of the upper airway in adults with obstructive sleep apnea/hypopnea syndrome." Laryngoscope. **118**(5): 902-908.
- Lindqvist, P., Calcuttea, A, Henein, M.** (2008). "Echocardiography in the assessment of right heart function." Eur J Echocardiogr. **9**(2): 225-234.
- Linß, W.** (1998). Kreislaufapparat. Histologie: Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie. W. Linß, Fanghänel, J. de Gruyter: 97.
- Liu, Y., Carretero, OA, Cingolani, OH, Liao, TD, Sun, Y, Xu, J, Li, LY, Pagano, PJ, Yang, JJ, Yang, XP.** (2005). "Role of inducible nitric oxide synthase in cardiac function and remodeling in mice with heart failure due to myocardial infarction." Am J Physiol Heart Circ Physiol. **289**(6): H2616-2623.
- Logan, A., Perlikowski, SM, Mente, A, Tisler A, Tkacova, R, Niroumand, M, Leung, RS, Bradley TD.** (2001). "High prevalence of unrecognized sleep apnoea in drug- resistant hypertension." J Hypertens. **19**(12): 2271-2277.
- Loredo, J., Ancoli-Israel, S, Dimsdale, JE.** (2001). "Sleep quality and blood pressure dipping in obstructive sleep apnea." Am J Hypertens. **14**: 887-892.
- Louis, M., Punjabi, NM** (2009). "Effects of acute intermittent hypoxia on glucose metabolism in awake healthy volunteers." J Appl Physiol. **106**(5): 1538-1544.
- Maekawa, M., Shiomi, T, Usui, K, Sasanabe, R, Kobayashi, T.** (1998). "Prevalence of ischemic heart disease among patients with sleep apnea syndrome." Psychiatry Clin Neurosci. **52**(2): 219-220.
- Mandegar, M., Fung, YC, Huang, W, Remillard, CV, Rubin, LJ, Yuan, JX.** (2004). "Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension." Microvasc Res. **68**: 75-103.
- Matthys, H. and W. Seeger** (2008). Klinische Pneumologie Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- McGuire, M., Bradford, A.** (2001). "Chronic intermittent hypercapnic hypoxia increases pulmonary arterial pressure and haematocrit in rats." Eur Respir J. **18**: 279-285.
- McLaughlin, V., Archer, SL, Badesch, DB, Barst, RJ, Farber, HW, Lindner, JR, Mathier, MA, McGoon, MD, Park, MH, Rosenson, RS. et al.** (2009). "ACCF/AHA 2009 expert consensus document on pulmonary hypertension: a report of the american college of cardiology foundation task force on expert consensus documents and the american heart association: developed in collaboration with the american college of chest physicians, american thoracic

- society, Inc., and the pulmonary hypertension association." Circulation. **53**: 1573-1619.
- McNicholas, W.** (2007). "Cardiovascular outcomes of CPAP therapy in obstructive sleep apnea syndrome." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. **293**(4): 1666-1670.
- McNicholas, W.** (2008). "Diagnosis of obstructive sleep apnea in adults." Proc Am Thorac Soc. **5**: 154-160.
- Mediano, O., Barceló, A, de la Peña, M, Gozal, D, Agustí, A, Barbé, F** (2007). "Daytime sleepiness and polysomnographic variables in sleep apnoea patients." Eur Respir J. **30**(1): 110-113.
- Mungrue, I., Gros, R, You, X, Pirani, A, Azad, A, Csont, T, Schulz, R, Butany, J, Stewart, DJ, Husain, M.** (2002). "Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death." J Clin Invest. **209**(6): 735-743.
- Murata, T., Kinoshita, K, Hori, M, Kuwahara, M, Tsubone, H, Karaki, H, Ozaki, H.** (2005). "Statin protects endothelial nitric oxide synthase activity in hypoxia-induced pulmonary hypertension." Arterioscler Thromb Vasc Biol. **25**(11): 2335-2342.
- NHMRC** (2000). "Effectiveness of nasal continuous positive airway pressure (nCPAP) in obstructive sleep apnoea in adults." The National Health and Medical Research Council Australia.
- Nieto, F., Young, TB, Lind, BK, Shahar, E, Samet, JM, Redline, S, D'Agostino, RB, Newman, AB, Lebowitz, MD, Pickering, TG.** (2000). "Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study." JAMA. **283**(14): 1829-1836.
- Nisbet, R., Graves, AS, Kleinhenz, DJ, Rupnow, HL, Reed, AL, Fan, TH, Mitchell, PO, Sutliff, RL, Hart, CM.** (2009). "The role of NADPH oxidase in chronic intermittent hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice." Am J Respir Cell Mol Biol. **40**(5): 601-609.
- Noda, A., Okada, T, Yasuma, F, Nakashima, N, Yokota, M.** (1995). "Cardiac hypertrophy in obstructive sleep apnea syndrome." Chest. **107**(6): 1538-1544.
- Ohayon, M., Guilleminault, C, Priest, RG, Zulley, J, Smirne, S.** (2000). "Is sleep-disordered breathing an independent risk factor for hypertension in the general population (13,057 subjects)?" J Psychosom Res. **48**(6): 593-501.
- Olschewski, H. a. S., W** (1994). "[Pathophysiology of pulmonary hypertension]." Z Kardiol. **83 Suppl 6**: 181-191.
- Pack, A., Gislason, T.** (2009). "Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease: a perspective and future directions." Prog Cardiovasc Dis. **51**(5): 434-451.
- Paravicini, T., Touyz, RM.** (2008). "NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities." Diabetes Care. **31 Suppl 2**: 170-180.
- Patt, B., Jarjoura, D, Haddad, DN, Sen, CK, Roy, S, Flavahan, NA, Khayat, RN.** (2010). "Endothelial dysfunction in the microcirculation of patients with obstructive sleep apnea." Am J Respir Crit Care Med. **182**(12): 1540-1545.
- Pautz, A., Art, J, Hahn, S, Nowag, S, Voss, C, Kleinert, H.** (2010). "Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase." Nitric Oxide. **23**(2): 75-93.

- Peppard, P., Young, T, Palta, M, Skatrud, J.** (2000). "Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension." N Engl J Med. **342**(19): 1378-1384.
- Philip, P., Gross, CE, Taillard, J, Bioulac, B, Guilleminault, C.** (2005). "An animal model of a spontaneously reversible obstructive sleep apnea syndrome in the monkey." Neurobiol Dis. **20**(2): 428-431.
- Polotsky, V., Rubin, AE, Balbir, A, Dean, T, Smith, PL, Schwartz, AR, O'Donnell, CP.** (2006). "Intermittent hypoxia causes REM sleep deficits and decreases EEG delta power in NREM sleep in the C57BL/6J mouse." Sleep Med. **7**(1): 7-16.
- Prabhat, K., Goyal, L, Bey, A, Maheshwari, S.** (2012). "Recent advances in the management of obstructive sleep apnea: The dental perspective." J Nat Sci Biol Med. **3**(2): 113-117.
- Prinsell, J.** (1999). "Maxillomandibular advancement surgery in a site-specific treatment approach for obstructive sleep apnea in 50 consecutive patients." Chest. **116**(6): 1519-1529.
- Pschyrembel** (2001). Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. W. d. G. G. C. KG. Berlin.
- Punjabi, N.** (2008). "The epidemiology of adult obstructive sleep apnea." Proc Am Thorac Soc. **15**;5(2): 136-143.
- Quintero, P., Milagro, FI, Campión, J, Martínez, JA.** (2010). "Impact of oxygen availability on body weight management." Med Hypotheses. **74**(5): 901-907.
- Rabkin, S., Chan, SH** (2012). "Correlation of pulse wave velocity with left ventricular mass in patients with hypertension once blood pressure has been normalized." Heart Int. **7**(1).
- Ramirez, T., Jourdan-Le Saux, C, Joy, A, Zhang, J, Dai, Q, Mifflin, S, Lindsey, ML.** (2012). "Chronic and intermittent hypoxia differentially regulate left ventricular inflammatory and extracellular matrix responses." Hypertens Res. **35**(8): 811-818.
- Rauscher, H.** (1992). Hyposomnien bei Atemstörungen. Schlafstörungen (Ursachen, Differentialdiagnose, Therapie). Wiener Internationale Akademie für Ganzheitsmedizin, Saletu, B, Stacher, A. **Schriftenreihe Band 5:** 51-53.
- RCoreTeam** (2013). R: a language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org>, R Foundation for Statistical Computing.
- Reinke, C., Bevans-Fonti, S, Grigoryev, DN, Drager, LF, Myers, AC, Wise, RA, Schwartz, AR, Mitzner, W, Polotsky, VY.** (2011). "Chronic intermittent hypoxia induces lung growth in adult mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. **300**(2): 266-273.
- Revermann, M., Barbosa-Sicard, E, Dony, E, Schermuly, RT, Morisseau, C, Geisslinger, G, Fleming, I, Hammock, BD, Brandes, RP.** (2009). "Inhibition of the soluble epoxide hydrolase attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats." J Hypertens. **27**(2): 322-331.
- Riley, R., Powell, NB, Li, KK, Troell, RJ, Guilleminault, C.** (2000). "Surgery and obstructive sleep apnea: long-term clinical outcomes." Otolaryngol Head Neck Surg. **122**(3): 415-421.
- Rose, E., Staats, R, Virchow, C, Jonas, IE.** (2002). "A comparative study of two mandibular advancement appliances for the treatment of obstructive sleep apnea." Eur J Orthod. **24**(2): 191-198.

- Rösen, P.** (2002). "Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose." J Kardiologie. **9**(9): 556-562.
- Rosenkranz, S.** (2007). "Pulmonary hypertension: current diagnosis and treatment." Clin Res Cardiol. **96**: 527-541.
- Rosenkranz, S., Behr, J, Ewert, R, Ghofrani, HA, Grünig, E, Halank, M, Hoeper, MM, Leuchte, HH, Olschewski, H, Schmeisser, A et al.** (2011). "[Right heart catheterization in pulmonary hypertension]." Dtsch Med Wochenschr. **136**(50): 2601-2625.
- Roth, D., Swaney, JS, Dalton, ND, Gilpin, EA, Ross, J Jr.** (2002). "Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol. **282**: 6.
- Ruetten, H., Dimmeler, S, Gehring, D, Ihling, C, Zeiher, AM.** (2005). "Concentric left ventricular remodeling in endothelial nitric oxide synthase knockout mice by chronic pressure overload." Cardiovasc Res. **66**(3): 444-453.
- Rus, A., Del Moral, ML, Molina, F, Peinado, MA.** (2011). "Upregulation of cardiac NO/NOS system during short-term hypoxia and the subsequent reoxygenation period." Eur J Histochem. **55**(2).
- Rus, A., Peinado, MA, Castro, L, Del Moral, ML.** (2010). "Lung eNOS and iNOS are reoxygenation time-dependent upregulated after acute hypoxia." Anat Rec (Hoboken). **293**(6): 1089-1098.
- S2-Leitlinie** (2008). Leitlinien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie - AWMF, Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL® - Deutsche Hypertonie Gesellschaft.
- S3-Leitlinie** (2009). Somnologie Schlafforschung und Schlafmedizin S3-Leitlinie Nicht erholsamer Schlaf/Schlafstörungen., SpringerMedizin.
- Sajkov, D., Wang, T, Saunders, NA, Bune, AJ, Mcevoy, RD.** (2002). "Continuous positive airway pressure treatment improves pulmonary hemodynamics in patients with obstructive sleep apnea." Am J Respir Crit Care Med. **165**(2): 152-158.
- Sajkov, D., Wang, T, Saunders, NA, Bune, AJ, Neill, AM, Douglas, Mcevoy, R.** (1999). "Daytime pulmonary hemodynamics in patients with obstructive sleep apnea without lung disease." Am J Respir Crit Care Med Vol. **159**: 1518-1526.
- Sankri-Tarbichi, A.** (2012). "Obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome: Etiology and diagnosis." Avicenna J Med. **2**(1): 3-8
- Satoh, M., Nakamura, M, Tamura, G, Makita, S, Segawa, I, Tashiro, A, Satodate, R, Hiramori, K** (1997). "Inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in myocardium in human dilated cardiomyopathy." J Am Coll Cardiol. **29**(4): 716-724.
- Savransky, V., Nanayakkara, A, Li, J, Bevans, S, Smith, PL, Rodriguez, A, Polotsky, VY.** (2007). "Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. ." Am J Respir Crit Care Med. **175**: 1290-1297.
- Schermuly, R., Ghofrani, HA, Wilkins, MR, Grimminger, F.** (2011). "Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension." Nat Rev Cardiol. **8**: 443-455.
- Schermuly, R., Grimminger, F.** (2008). "[Update in basic research in the therapy of pulmonary arterial hypertension]." Dtsch Med Wochenschr. **133 Suppl 6**: 170-172.
- Schneider, M.** (2008). Pathophysiologie der Herzinsuffizienz-Ein Leitaden durch Definitionen und Regelsysteme. Kleintierkardiologie kompakt. R. Tobias, Skrodzki, M, Schneider, M, Schlütersche: 7-10.

- Schulte, W.** (2004). "Der Tei-Index - ein neuer Börsen-Index?" Pneumologie. **58**(4): 206-207.
- Schulz, R., Eisele, HJ, Weissmann, N, Seeger, W.** (2005). "Pulmonale Hypertonie und schlafbezogene Atmungsstörungen. Pulmonary hypertension and sleep-related breathing disorders." Pneumologie. **59**(4): 270-374.
- Schulz, R., Olschewski, H, Grimminger, F, Seeger, W.** (2000a). "Prävalenz von Schlaganfall und transitorischer ischämischer Attacke (TIA) bei obstruktiver Schlaf-Apnoe: eine retrospektive Erhebung an 187 konsekutiven Patienten." Pneumologie. **54**: 575-579.
- Schulz, R., Schmidt, D, Blum, A, Lopes-Ribeiro, X, Lücke, C, Mayer, K, Olschewski, H, Seeger, W, Grimminger, F.** (2000b). "Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy." Thorax. **55**(12): 1046-1051.
- Schwarting, S., Huebers, U, Heise, M, Schlieper, J, Hauschild, A.** (2007). "Position paper on the use of mandibular advancement devices in adults with sleep-related breathing disorders." Sleep Breath. **11**: 125-126.
- Schwartz, A., Patil, SP, Laffan, AM, Polotsky, V, Schneider, H, Smith, PL.** (2008). "Obesity and obstructive sleep apnea: pathogenic mechanisms and therapeutic approaches." Proc Am Thorac Soc. **5**(2): 185-192.
- Seimetz, M., Parajuli, N, Pichl, A, Veit, F, Kwapiszewska, G, Weisel, FC, Milger, K, Egemnazarov, B, Turowska, A, Fuchs, B, Nikam, S, Roth, M, Sydykov, A, Medebach, T, Klepetko, W, Jaksch, P, Dumitrascu, R, Garn, H, Voswinckel, R, Kostin, S, Seeger, W, Schermuly, RT, Grimminger, F, Ghofrani, HA, Weissmann, N.** (2011). "Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice." Cell. **147**(2): 293-305.
- Shesely, E., Maeda, N, Kim, HS, Desai, KM, Krege, JH, Laubach, VE, Sherman, PA, Sessa, WC, Smithies, O.** (1996). "Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. ." Proc Natl Acad Sci U S A. **93**(23): 13176-13181.
- Shibata, K., Yatera, Y, Furuno, Y, Sabanai, K, Morisada, N, Nakata, S, Morishita, T, Yamazaki, F, Tanimoto, A, Sasaguri, Y, Tasaki, H, Nakashima, Y, Shimokawa, H, Yanagihara, N, Otsuji, Y, Tsutsui, M.** (2010). "Spontaneous development of left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in mice lacking all nitric oxide synthases." Circ J. **74**(12): 2681-2692.
- Simonneau, G., Robbins, IM, Beghetti, M, Channick, RN, Delcroix, M, Denton, CP, Elliott, CG, Gaine, SP, Gladwin, MT, Jing, ZC, Krowka, MJ, Langleben, D, Nakanishi, N, Souza, R.** (2009). "Updated clinical classification of pulmonary hypertension." J Am Coll Cardiol. **54**: 43-54.
- Singh, S., Selvamurthy, W.** (1993). "Effect of intermittent chronic exposure to hypoxia on feeding behaviour of rats." Int J Biometeorol. **37**(4): 200-202.
- Smith, I., Lasserson, TJ, Wright, J.** (2006). "Drug therapy for obstructive sleep apnoea in adults." Cochrane Database Syst Rev. **19**(2).
- Snow, J., Kitzis, V, Norton, CE, Torres, SN, Johnson, KD, Kanagy, NL, Walker, BR, Resta, TC** (2008). "Differential effects of chronic hypoxia and intermittent hypocapnic and eucapnic hypoxia on pulmonary vasoreactivity." J Appl Physiol. **104**(1): 110-118.
- Somers, V., White, DP, Amin, R, Abraham, WT, Costa, F, Culebras, A, Daniels, S, Floras, JS, Hunt, CE, Olson, LJ, Pickering, TG, Russell, R, Woo, M,**

- Young, T; American Heart Association Council for High Blood Pressure Research Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology; American Heart Association Stroke Council; American Heart Association Council on Cardiovascular Nursing; American College of Cardiology Foundation.** (2008). "Sleep apnea and cardiovascular disease: an american heart association/american college of cardiology foundation scientific statement from the american heart association council for high blood pressure research professional education committee, Council on clinical cardiology, stroke council, and council on cardiovascular nursing. In collaboration with the national heart, lung, and blood institute national center on sleep disorders research (national institutes of health)." Circulation. **118**(10): 1080-1011.
- Sommer, N., Dietrich, A, Schermuly, RT, Ghofrani, HA, Gudermann, T, Schulz, R, Seeger, W., Grimminger, F, Weissmann, N** (2008). "Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms." Eur Respir J. **32**: 1639-1651.
- Stenmark, K., Davie, N, Frid, M, Gerasimovskaya, E, Das, M.** (2006a). "Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling." Physiology. **21**: 134-145.
- Stenmark, K., Fagan, KA, Frid, MG.** (2006b). "Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms." Circ Res. **99**: 657-691.
- Steudel, W., Scherrer-Crosbie, M, Bloch, KD, Weimann, J, Huang, PL, Jones, RC, Picard, HM, Zapol, WM** (1998). "Sustained pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy after chronic hypoxia in mice with congenital deficiency of nitric oxide synthase 3." J Clin Invest. **101**(11): 2468-2477.
- Stypmann, J., Engelen, MA, Troatz, C, Rothenburger, M, Eckardt, L, Tiemann, K.** (2009). "Echocardiographic assessment of global left ventricular function in mice." Lab Anim. **43**(2): 127-137.
- Sullivan, C., Issa, FG, Berthon-Jones, M, Eves, L.** (1981). "Reversal of obstructive sleep apnea by continuous positive airway pressure applied through the nares." Lancet. **1**(8225): 862-865.
- Sundaram, S., Bridgman, SA, Lim, J, Lasserson, TJ.** (2005). "Surgery for obstructive sleep apnoea." Cochrane Database Syst Rev. **19**(4).
- Tagaito, Y., Polotsky, VY, Campen, MJ, Wilson, JA, Balbir, A, Smith, PL, Schwartz, AR, O'Donnell, CP.** (2001). "A model of sleep-disordered breathing in the C57BL/6J mouse." J Appl Physiol. **91**: 2758-2766.
- The_Jackson_Laboratory.** (2013). "B6.129P2-Nos3tm1Unc/J." from <http://jaxmice.jax.org/strain/002684.html>.
- Thorpy, M.** (2012). "Classification of sleep disorders." The American Society for Experimental NeuroTherapeutics **9**: 687-701.
- Tuder, R., Marecki, JC, Richter, A, Fijalkowska, I, Flores, S** (2007). "Pathology of pulmonary hypertension. ." Clin Chest Med. **28**: 23-42.
- Tugcu, A., Yildirimtürk, O, Tayyareci, Y, Demiroglu, C, Aytekin, S.** (2010). "Evaluation of subclinical right ventricular dysfunction in obstructive sleep apnea patients using velocity vector imaging." Circ J. **74**(2): 312-319.
- Uematsu, M.** (2010). "Is right ventricular dysfunction in obstructive sleep apnea a potential screening tool?" Circ J. **74**(2): 250-251.
- Urdampilleta, A., González-Muniesa, P, Portillo, MP, Martínez, JA.** (2012). "Usefulness of combining intermittent hypoxia and physical exercise in the treatment of obesity." J Physiol Biochem. **68**(2): 289-304.

- Van Vliet, B., Chafe, LL, Montani, JP.** (2003). "Characteristics of 24 h telemetered blood pressure in eNOS-knockout and C57Bl/6J control mice." J Physiol. **549** (Pt 1): 313-325.
- Vanderveken, O., Devolder, A, Marklund, M, Boudewyns, AN, Braem, MJ, Okkerse, W, Verbraecken, JA, Franklin, KA, De Backer, WA, Van de Heyning, PH.** (2008). "Comparison of a custom-made and a thermoplastic oral appliance for the treatment of mild sleep apnea." Am J Respir Crit Care Med. **178**(2): 197-202.
- Vásquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B, Martásek, P, Hogg, N, Masters, BS, Karoui, H, Tordo, P, Pritchard, KA Jr.** (1998). "Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors." Proc Natl Acad Sci U S A. **95**(16): 9220-9225.
- Veasey, S., Guilleminault, C, Strohl, KP, Sanders, MH, Ballard, RD, Magalang, UJ.** (2006). "Medical therapy for obstructive sleep apnea: a review by the Medical Therapy for Obstructive Sleep Apnea Task Force of the Standards of Practice Committee of the American Academy of Sleep Medicine." Sleep. **29**(8): 1036-1044.
- Verdecchia, P., Schillaci, G, Borgioni, C, Ciucci, A, Gattobigio, R, Zampi, I, Porcellati, C.** (1998). "Prognostic value of a new electrocardiographic method for diagnosis of left ventricular hypertrophy in essential hypertension." J Am Coll Cardiol. **31**(2): 383-390.
- Vonk Noordegraaf, A., Galiè, N.** (2011). "The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension." Eur Respir Rev. **20**: 243-253.
- Walker-Engström, M., Tegelberg, A, Wilhelmsson, B, Ringqvist, I.** (2002). "4-year follow-up of treatment with dental appliance or uvulopalatopharyngoplasty in patients with obstructive sleep apnea: a randomized study." Chest. **121**(3): 739-746.
- Walker, R., Levine, HL, Hopp, ML, Greene, D.** (2007). "Extended follow-up of palatal implants for OSA treatment." Otolaryngol Head Neck Surg. **137**(5): 822-827.
- Weaver, T., Grunstein, RR.** (2008). "Adherence to continuous positive airway pressure therapy: the challenge to effective treatment." Proc Am Thorac Soc. **5**(2): 173-178.
- Weissmann, N., Grimminger, F, Olschewski, A, Seeger, W.** (2001). "Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response?" Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. **281**: 314-317.
- Weyrauch, K., Smollich, A.** (1998). Kreislaufsystem und Blut. Histologie-Kurs für Veterinärmediziner. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart.: 42-45.
- Won, C., Li, KK, Guilleminault, C.** (2008). "Surgical treatment of obstructive sleep apnea: upper airway and maxillomandibular surgery." Proc Am Thorac Soc. **5**(2): 193-199.
- Woods, D., Stacey, M, Hill, N, de Alwis, N.** (2011). "Endocrine aspects of high altitude acclimatization and acute mountain sickness." J R Army Med Corps. **157**(1): 33-37.
- Wu, J., Bu, L, Gong, H, Jiang, G, Li, L, Ma, H, Zhou, N, Lin, L, Chen, Z, Ye, Y, Niu, Y, Sun, A, Ge, J, Zou, Y.** (2010). "Effects of heart rate and anesthetic timing on high-resolution echocardiographic assessment under isoflurane anesthesia in mice." J Ultrasound Med. **29**(12): 1771-1778.

- Yang, X., Liu, YH, Rhaleb, NE, Kurihara, N, Kim, HE, Carretero, OA.** (1999). "Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice." Am J Physiol. **277**: H1967-1974.
- Young, T., Palta, M, Dempsey, J, Skatrud, J, Weber, S, Badr, S.** (1993). "The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults." N Engl J Med.(17): 1230-1235.
- Young, T., Peppard, P, Palta, M, Hla, KM, Finn, L, Morgan, B, Skatrud, J.** (1997). "Population-based study of sleep-disordered breathing as a risk factor for hypertension." Arch Intern Med. **15**: 1746-1752.
- Young, T., Peppard, PE, Gottlieb, DJ.** (2002). "Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective." Am J Respir Crit Care Med. **165**: 1217-1239.
- Zhang, J., Veasey, S.** (2012b). "Making sense of oxidative stress in obstructive sleep apnea: mediator or distracter?" Front Neurol. **3 Article 179.**
- Zhang, P., Xu, X, Hu, X, van Deel, ED, Zhu, G, Chen, Y.** (2007b). "Inducible nitric oxide synthase deficiency protects the heart from systolic overload-induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure." Circ Res. **100**(7): 1089-1098.
- Zhang, W., Si, LY.** (2012a). "Obstructive sleep apnea syndrome (OSAS) and hypertension: Pathogenic mechanisms and possible therapeutic approaches." Upsala Journal of Medical Sciences. **117**: 370-382.
- Zhang, Y., Takagawa, J, Sievers, RE, Khan, MF, Viswanathan, MN, Springer, ML, Foster, E, Yeghiazarians, Y.** (2007a). "Validation of the wall motion score and myocardial performance indexes as novel techniques to assess cardiac function in mice after myocardial infarction." Am J Physiol Heart Circ Physiol. **292**(2): H1187-1192.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.2.1: Schematischer Aufbau des Systems.	45
Abbildung 2.2.2: Schematischer Aufbau der Oxymetriemessung.	46
Abbildung 2.2.3: Schematischer Aufbau der Blutdruckmessung.	48
Abbildung 2.2.4: Versuchsverlauf für alle Gruppen.	49
Abbildung 2.2.5: Bestimmung des Muskularisierungsgrades.	58
Abbildung 2.2.6: Beispiel für ein mit anti-alpha Aktin/ anti-von-Willebrand-Faktor gefärbtes Lungengefäß.	60
Abbildung 2.2.7: Bestimmung des Kollagengehaltes.	61
Abbildung 3.1.1: Darstellung der Entwicklung von Atemfrequenz, Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung der WT Mäuse unter CIH.	70
Abbildung 3.1.2: Darstellung der Entwicklung von Atemfrequenz, Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung der iNOS KO Mäuse unter CIH.	71
Abbildung 3.1.3: Darstellung der Entwicklung von Atemfrequenz, Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung der eNOS KO Mäuse unter CIH.	72
Abbildung 3.1.4: Darstellung der Sauerstoffsättigung von allen drei Mauslinien unter Normoxie und CIH.	73
Abbildung 3.1.5 a): Darstellung des Ausgangsgewichts der WT, iNOS und eNOS KO Mäuse	74
Abbildung 3.1.5 b): Darstellung der prozentualen Gewichtänderung nach 6 Wochen CIH-bzw. Normoxieexposition.	75
Abbildung 3.1.6: Darstellung des Hämatokritwertes der WT, iNOS und eNOS KO Mäuse.	76
Abbildung 3.1.7: Darstellung der Ratio von rechtem Ventrikel zu linkem Ventrikel plus Septum.	76
Abbildung 3.1.8: Darstellung der Ratio von rechtem Ventrikel zum Körpergewicht.	77
Abbildung 3.1.9: Darstellung der Ratio von linkem Ventrikel plus Septum zum Körpergewicht.	78
Abbildung 3.1.10: Darstellung der Ratio vom Gesamtherzgewicht zum Körpergewicht.	79

Abbildung 3.1.11 a): Darstellung der Entwicklung des systolischen Blutdrucks der WT Mäuse unter CIH.	80
Abbildung 3.1.11 b): Systolische Blutdrücke der WT Mäuse in der ersten und letzten Woche.	81
Abbildung 3.1.12 a): Darstellung der Entwicklung des systolischen Blutdrucks der iNOS KO Mäuse unter CIH.	81
Abbildung 3.1.12 b): Systolische Blutdrücke der iNOS KO Mäuse in der ersten und letzten Woche.	82
Abbildung 3.1.13 a): Darstellung der Entwicklung des systolischen Blutdrucks unter CIH der eNOS KO Mäuse	83
Abbildung 3.1.13 b): Systolische Blutdrücke der eNOS KO Mäuse in der ersten und letzten Woche.	84
Abbildung 3.1.14 a): Darstellung der Entwicklung des diastolischen Blutdrucks der WT Mäuse unter CIH	85
Abbildung 3.1.14 b): Diastolische Blutdrücke der WT Mäuse in der ersten und letzten Woche.	86
Abbildung 3.1.15 a): Darstellung der Entwicklung des diastolischen Blutdrucks der iNOS KO Mäuse unter CIH	86
Abbildung 3.1.15 b): Diastolische Blutdrücke der iNOS KO Mäuse in der ersten und letzten Woche.	87
Abbildung 3.1.16 a): Darstellung der Entwicklung des Blutdrucks der eNOS KO Mäuse unter CIH.	88
Abbildung 3.1.16 b): Diastolische Blutdrücke der eNOS KO Mäuse in der ersten und letzten Woche.	89
Abbildung 3.1.17 a): Darstellung der Entwicklung des MAP der WT Mäuse unter CIH.	90
Abbildung 3.1.17 b): MAP der WT Mäuse in der ersten und letzten Woche.	91
Abbildung 3.1.18 a): Darstellung der Entwicklung des MAP der iNOS KO Mäuse unter CIH.	91
Abbildung 3.1.18 b): MAP der iNOS KO Mäuse in der ersten und letzten Woche.	92

Abbildung 3.1.19 a): Darstellung der Entwicklung des MAP der eNOS KO Mäuse unter CIH.	93
Abbildung 3.1.19 b): MAP der eNOS KO Mäuse in der ersten und letzten Woche.	94
Abbildung 3.1.20: Vergleichende Darstellung des MAP aller 3 Mauslinien.	94
Abbildung 3.1.21: Darstellung des RVSP aller 3 Mauslinien.	95
Abbildung 3.2.1: Darstellung des prozentualen Anteils nicht-, partiell- und voll-muskularisierter kleiner Lungengefäße (\varnothing 20 – 70 μ m) von allen 3 Mauslinien.	97
Abbildung 3.2.2: Darstellung des prozentualen Kollagengehaltes der linken Ventrikel in allen 3 Mauslinien.	98
Abbildung 3.2.3: Darstellung des prozentualen Kollagengehaltes der rechten Ventrikel in allen 3 Mauslinien.	99
Abbildung 3.3.1: Endpunktmessung des Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) und Herzindex (CI, cardiac index) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	100
Abbildung 3.3.2: Endpunktmessung der systolischen Funktion des linken Ventrikels (EF, ejection fraction) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	101
Abbildung 3.3.3: Endmessung der peak systolic velocity des linken (LVS') bzw. rechten Ventrikels (RVS') im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	102
Abbildung 3.3.4: Endpunktmessung der systolischen Funktion des rechten Ventrikels (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	102
Abbildung 3.3.5: Endpunktmessung der diastolische Funktion der linken (LV) und rechten Ventrikel (RV) (IVRT, isovolumic relaxation time) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	103
Abbildung 3.3.6: Endpunktmessung der systolischen Funktion des linken Ventrikels (LV E' (early) and A' (late) peak diastolic velocities ratio) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	104

Abbildung 3.3.7: Endmessung der globalen Funktion des linken (LV) bzw. rechten Ventrikels (RV) (MPI, myocardial performance index) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	105
Abbildung 3.4.1: Darstellung der Genexpression von iNOS und eNOS in Lungenhomogenat von WT Mäusen im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	106
Abbildung 3.4.2: Darstellung der Genexpression von iNOS und eNOS im Homogenat des linken und rechten Ventrikels von WT Mäusen im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	107
Abbildung 3.4.3: Darstellung der Genexpression von iNOS und eNOS im Gefäßhomogenat von WT Mäusen im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	108
Abbildung 3.4.4: Darstellung der Proteinmenge von eNOS und iNOS im Lungenhomogenat der WT Mäuse im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	110
Abbildung 3.4.5: Darstellung der Proteinmenge von eNOS und iNOS im Homogenat des linken Ventrikels der WT Mäuse im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	111
Abbildung 3.4.6: Darstellung der Proteinmenge von eNOS und iNOS im Homogenat des rechten Ventrikels der WT Mäuse im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	112

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1.1: Klassifikation des Schlafapnoe-Syndroms nach ICD-10.	10
Tabelle 1.1.2: Einteilung des Schweregrades des obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms.	11
Tabelle 1.1.3: Risikofaktoren des obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms.	14
Tabelle 1.1.4: Einteilung der Hypertonie nach ICD-10.	18
Tabelle 1.1.5: Einteilung der Hypertonie nach Höhe des Blutdrucks.	18
Tabelle 1.1.6: Einteilung der pulmonalen Hypertonie.	21
Tabelle 1.1.7: Prävalenz der PH bei Patienten mit OSAS.	27
Tabelle 2.1.1: Verwendete Primer für die real-time PCR.	43
Tabelle 2.1.2: Verwendete Antikörper und ihre Verdünnung.	44
Tabelle 3.1.1: Werte der oxymetrisch gemessenen Sauerstoffsättigung, Herzfrequenz und Atemfrequenz der WT Mäuse.	70
Tabelle 3.1.2: Werte der oxymetrisch gemessenen Sauerstoffsättigung, Herzfrequenz und Atemfrequenz der iNOS KO Mäuse.	71
Tabelle 3.1.3: Werte der oxymetrisch gemessenen Sauerstoffsättigung, Herzfrequenz und Atemfrequenz der eNOS KO Mäuse.	72
Tabelle 3.2.1: Prozentualer Muskularisierungsgrad der kleinen Lungengefäße (\varnothing 20 - 70 μ m) von allen 3 Mauslinien.	96
Tabelle 3.2.2: Prozentualer Kollagengehalt des linken und rechten Ventrikels von allen 3 Mauslinien	98
Tabelle 3.3.1: Herzminutenvolumen (CO, cardiac output) und Herzindex (CI, cardiac index) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	100
Tabelle 3.3.2: Werte der systolischen Funktion des linken Ventrikels (EF; ejection fraction) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	101
Tabelle 3.3.3: Werte der peak systolic velocity des linken (LVS') und rechten (RVS') Herzens im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	101
Tabelle 3.3.4: Werte der systolischen Funktion des rechten Ventrikels (TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	102

Tabelle 3.3.5: Werte der diastolischen links (LV)- und rechtsventrikulären (RV) Funktion (IVRT, isovolumic relaxation time) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	103
Tabelle 3.3.6: Werte der systolischen Funktion des linken Ventrikels (LV E' (early) and A' (late) peak diastolic velocities ratio) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	104
Tabelle 3.3.7: Werte der linken und rechten globalen Funktion des Herzens (MPI, myocardial performance index) im Modell der chronisch intermittierenden Hypoxie.	105

10. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Simone Kraut

11. Wissenschaftliche Beiträge

11.1 Veröffentlichungen

Journal of Hypertension 2014, Feb; 32(2):300-5.

doi:10.1097/HJH.000000000000016.

"Arterial hypertension in a murine model of sleep apnea - role of NADPH oxidase 2".

Richard Schulz, Gulsina Murzabekova, Bakytbek Egemnazarov, **Simone Kraut**, Hans-Joachim Eisele, Rio Dumitrascu, Jörg Heitmann, Michael Seimetz, Martin Witzernath, Hossein Ardeschir Ghofrani, Ralph Theo Schermuly, Friedrich Grimminger, Werner Seeger and Norbert Weissmann

Perfusion, 02/2013, 26. Jahrgang, 62-63 (Abstract)

"Effect of intermittent hypoxia (sleeping apnea) on skeletal muscle vascularisation in wildtype and inducible nitric oxide synthase knockout (iNOS^{-/-}) mice". L. Dill, G.A. Bonaterra, H. Then, R. Schulz, **S. Kraut**, N. Weissmann, R. Kinscherf, W. Hildebrandt

Somnologie, Suppl 1, 2013, 63, Abstract P14

"Mausmodell der chronisch intermittierenden Hypoxie führt zu arterieller und pulmonaler Hypertonie". **Kraut S**, Haag D, Kojonazarov B, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Weissmann N, Schulz R.

11.2 Kongressbeiträge

"Pulmonale Hypertonie in einem Mausmodell der chronisch intermittierenden Hypoxie" (Gemeinsame Jahrestagung AG Apnoe / AG Kreislauf und Schlaf (DGSM), Sektion Schlafmedizin (DGP), AG kardiovaskuläre Erkrankungen und SBAS (DGK), Krankenhaus der Augustinerinnen, Köln, 2013), **Vortrag**

"Bluthochdruck in einem Mausmodell der Schlafapnoe: Die Rolle der NADPH Oxidase 2" (21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Schlafforschung und Schlafmedizin (DGSM) e. V., Rhein-Main-Hallen, Wiesbaden, 2013), **Vortrag**

"Mausmodell der chronisch intermittierenden Hypoxie führt zu arterieller und pulmonaler Hypertonie" (21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Schlafforschung und Schlafmedizin (DGSM) e. V., Rhein-Main-Hallen, Wiesbaden, 2013), **Poster**

11.3 Preise

Nachwuchspreis Kreislauf und Schlaf der DGSM 2013, gestiftet von der Firma ResMed in der Kategorie „Pathophysiologie und Interventionsstudien“, für die Arbeit: *"Arterial hypertension in a murine model of sleep apnea - role of NADPH oxidase 2"*, Wiesbaden

12. Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei all jenen bedanken, die auf unterschiedlichste Art und Weise am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren. Bei...

...Herrn Prof. Dr. Andreas Moritz für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin

...Herrn Prof. Dr. Norbert Weißmann für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die „externe“ Betreuung (mit allem was dazugehört) und schnelle Begutachtung dieser Arbeit.

...Herrn Prof. Dr. Werner Seeger dafür, dass ich im ECCPS meine Dissertation anfertigen konnte und er meine Bewerbungsanfrage so schnell weitergeleitet hat.

...Daniela Haag, die mir in so vielen Dingen mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat, dass eine genaue Auflistung den Rahmen dieser Danksagung sprengen würde.

...Dr. Stephanie Gembardt und Dr. Dorothea Peters für die Unterstützung sowie für die Begutachtung und Korrektur von Vorträgen, Abstracts und dieser Doktorarbeit.

...Herrn Dr. Baktybek Kojonazarov für die Echosessions, die witzigen Gespräche sowie den regen Gedanken- und Meinungsaustausch.

...Karin Quanz für ihren Beistand in allen Lebenslagen und dafür, dass sie immer ein offenes Ohr, aber auch einen „offenen Mund“ hatte.

...Dr. Katja „Corinna“ Helmus für die schönen Stunden, die wir in der Histo verbracht haben, ihre tatkräftige Unterstützung und die tollen „Tierarztgespräche“.

...Ingrid Breitenborn-Müller dafür, dass ich immer an ihre Tür „klopfen“ durfte.

...Lisa Fröhlich, Silke Köbrich, Christina Vroom, Ewa Bienek, Carmen Homberger, Elisabeth Kappes, Jochen Wilhelm, Sabrina Schick und Martin Stellwagen für die technische Unterstützung und freundliche Atmosphäre.

...Gulsina Murzabekova für das Anlernen und die schönen Gespräche während der Messzeiten.

...Dr. Alkylbek Sydykov für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei allen Fragen die ich hatte.

...allen Mitarbeitern des ECCPS, darunter besonders Alexandra Pichl, Ruth Dartsch, Athanasios Fysikopoulos, Mareike Gierhardt, Mariola Bednorz, Alexandra Erb, Azadeh Esfandiary ohne die das Arbeiten nur halb so schön gewesen wäre.

...Sabrina Elmshäuser für die Gestaltung des Coverbildes und den ganzen Spaß, den wir dabei (und sonst auch immer) hatten.

...allen meinen Freunden dafür, dass sie mir immer wieder gezeigt haben, dass es auch ein Leben außerhalb des Labors gibt.

...allen Tieren die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

...Mausi, Snoopy, Lucy, Charly Brown, Pauline, Krümmel, Tabby, Emil, Bruno, Klex, Finya, Paula, Fred, Caprice, Klara, Silver Surfer, Pünktchen und Antonia.

Der größte Dank geht jedoch an meine Familie, besonders an meine Eltern Adelheid und Alfred Kraut dafür, dass sie mich in meinem Berufswunsch bedingungslos unterstützt haben, mich immer motiviert und wieder aufgebaut haben und dadurch entscheidend am Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

**DAS VORLIEGENDE WERK IST KEINE ÖFFENTLICHE PUBLIKATION
BESTIMMT NUR FÜR INTERNE ZWECKE - OHNE ISBN**

VVB Nr.: 6143